

**UNTERSUCHUNGEN ZUR TOPOGRAPHIE DES DCCD-
BINDENDEN PROTEINS IM ATPase KOMPLEX AUS
NEUROSPORA CRASSA**

DR. RER. NAT. THOMAS M. GRAF

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Physiologische Chemie,
Physikalische Biochemie und Zellbiologie
der Universität München

Vorstände: Prof.Dr. V.Herzog(Komm.),Prof.Dr.E.M.
Klingenberg, Prof.Dr.Dr.W.Neupert, Prof.Dr.H.G.
Zachau

Untersuchungen zur Topographie
des DCCD-bindenden Proteins
im ATPase Komplex aus
Neurospora crassa

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-
Universität zu München

vorgelegt von
Dr.rer.nat.Thomas M. Graf
aus

Karlsruhe

Mai 1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Dr. rer. nat. E. Wachter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Neupert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 06. 1986

Für

Gertie

Nico

Stephanie

Hannah

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 1978 bis Oktober 1980 am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr.rer.nat. Dr.med.h.c. Theodor Bücher und Herrn Akad.O.rat Dr.rer.nat. Elmar Wachter.

Herrn Prof. Bücher danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die großzügige Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Neupert danke ich für sein Interesse und die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. E. Wachter. Er hat die vorliegende Arbeit angeregt und durch verständnisvolle, freundschaftliche Zusammenarbeit unterstützt. Zudem wurden die Aminosäuresequenzen von ihm erstellt.

Mit ganzem Herzen bin ich allen, auch ehemaligen Mitgliedern des Instituts für Physiologische Chemie verbunden, mit denen ich zusammengearbeitet habe. Die hier geknüpften, freundschaftlichen Kontakte mit vielen von ihnen schätze ich ebenso wie die fachliche Zusammenarbeit, die vielfältigen Anregungen und Gespräche.

Dank nicht zuletzt an meine Familie für finanzielle Unterstützung und ermunternde Worte. Meine Frau Gertrud stand mir bei der Erstellung der Vorlage tatkräftig und fachkundig zur Seite.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. PLAN	14
3. ERGEBNISSE	23
3.1. Oberflächenmarkierungen mit Dansylchlorid	23
3.1.1. Umsetzung des isolierten, in SDS denaturierten Peptids mit Dansylchlorid	23
3.1.2. Umsetzung der isolierten Proteolipid-Untereinheit mit Dansylchlorid in Chloroform/Methanol/Wasser	32
3.1.3. Umsetzung submitochondrialer Partikel mit Dansylchlorid	38
3.1.4. Umsetzung intakter Mitochondrien mit Dansylchlorid	44
3.2. Der Einsatz proteolytischer Enzyme	50
3.2.1. Proteolytische Verdauung submitochondrialer Partikel mit Trypsin	50
3.2.2. Proteolytische Verdauung ganzer Mitochondrien mit Papain und Bromelain	54
3.2.3. 35S - DABS Markierung des mitochondrialen ATPase Komplexes	57
4. MATERIALIEN UND METHODEN	
4.1. Zellfraktionen aus <u>Neurospora crassa</u>	61
4.1.1. Zellkultur	61
4.1.2. 3H-Markierung der Hyphen	61
4.1.3. Präparation von Mitochondrien	61
4.1.4. Präparation submitochondrialer Partikel (SMP)	61
4.2. Anreicherung der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit aus <u>Neurospora crassa</u>	63
4.3. Immunpräzipitation des ATPase Komplexes	64
4.3.1. Herstellung des Antigens (F_1 -ATPase)	64
4.3.2. Gewinnung des Antiserums	65

	Seite
4.3.3. Immunpräzipitation	66
4.4. Oberflächenmarkierung des ATPase Komplexes mit 35S-DABS	66
4.4.1. Herstellung der 35S-Diazobenzolsulfonsäure	66
4.4.2. Zählausbeute und Halbwertszeit von 35S-DABS	67
4.4.3. Azokupplung des membranintegrierten ATPase Komplexes	68
4.5. Oberflächenmarkierung mit Dansylchlorid	69
4.5.1. Umsetzung der isolierten Proteolipid-Unter- einheit	69
4.5.1.1. Umsetzung in 2% SDS	69
4.5.1.2. Umsetzung in Chloroform-Methanol-Wasser (3:3:1; v/v/v)	69
4.5.2. Umsetzung des membranintegrierten ATPase Komplexes	70
4.6. Proteolytische Verdauung mitochondrialer Membran	71
4.6.1. Verdauung mit Trypsin	71
4.6.2. Proteolytische Verdauung mit Papain und Bromelain	71
4.7. P-30 Gelchromatographie	72
4.8. BrCN-Spaltung	73
4.9. Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung dansylierter Aminosäuren	74
4.10. Aminosäurenanalyse	75
4.11. Sonstige analytische Methoden	
4.11.1. Proteinbestimmung	75
4.11.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	75
4.11.3. Radioaktivitätsmessungen	77
4.12. Verwendete Materialien	77

5. DISKUSSION	
5.1. Eigenschaften von Membranproteinen	80
5.2. Funktionen der F_o -Membranproteine	80
5.3. Eigenschaften der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit	81
5.4. Diskussion der eigenen Ergebnisse	85
5.4.1. Markierungen mit Dansylchlorid	88
5.4.2. Oberflächenmarkierung mit p-Diazoniumbenzol-(35S) sulfonsäure (DABS)	91
5.4.3. Der Einsatz von Proteasen	92
5.4.4. Topographie der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit	93
6. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	95
7. ZUSAMMENFASSUNG	98
8. LITERATURVERZEICHNIS	100

1. EINLEITUNG

"Betrachtet man den Prozeß des Lebens in seiner molekularen Logik, so stellen sich die Zellen als chemische Maschinen dar, die unter den Bedingungen von hinreichend konstanter Temperatur, Druck- und Volumen Arbeit verrichten können. Genau wie die von Menschen hergestellten Maschinen müssen lebende Organismen ihren Energiebedarf aus der umgebenden Umwelt decken. Photosynthesetreibende Organismen verwerten die Strahlungsenergie des Sonnenlichts, während die Heterotrophen die in der Struktur organischer Nährstoffmoleküle gespeicherte Energie nutzen, die sie aus ihrer Umgebung beziehen.

Diese Energieformen werden von den Zellen in die chemische Energie des Adenosintriphosphates (ATP) transformiert, das den energieverbrauchenden Prozessen in der Zelle als Energiespender dient."

(53).

Nach dem Modell der "chemiosmotischen Kopplung" (61) sind die energieliefernden Prozesse (Elektronenfluß durch Substratoxidation oder durch Absorption von Lichtquanten) mit der Synthese von ATP aus ADP und P_a durch einen elektrochemischen Protonengradienten über biologische Membranen gekoppelt. Als Energietransformator dient der ATP-Synthase Komplex: In einer an die H^+ -Translokation gekoppelten Reaktion wird ATP gebildet (63, 83).

Der Energiefluß zwischen den Elektronentransfer-Komplexen und den ATP-synthetisierenden Systemen ist reversibel. Der ATP-Synthesekomplex kann Energie aus der Hydrolyse von ATP benutzen und den Elektronenfluß umkehren, d. h. Substrat des Atmungskomplexes reduzieren oder energieverbrauchende Prozesse wie Transhydrogenierung von Pyridinnukleotiden, aktiven Transport etc. ankurbeln. Er ist in der Lage, unter Verbrauch von ATP H^+ -Ionen gegen den elektrochemischen Gradienten durch die hydrophobe Region der Membran zu transportieren und durch Aufbau eines elektrischen Potentials Energie zu konservieren (H^+ -ATPase; 44, 51).

Dieser naturgemäß membrangebundene Prozeß findet an der mitochondrialen Innenmembran, den Thylakoidmembranen von Chloroplasten und dem Plasmalemm von Bakterien statt, wo sich - membranintegriert bzw. assoziiert - die Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung, der Photosynthese und der ATP-Synthese befinden (= energietransduzierende Membranen (44, 46, 51, 75, 116)).

So abgerundet und wohl auch experimentell fundiert sich das Prinzip der Energietransformation darstellt (32, 62, 103), ein molekularer Mechanismus, der die Katalyse der ATP-Synthese durch das vielleicht komplizierteste Enzym in energietransduzierenden Membranen beschreibt, steht noch aus (117).

In den Bemühungen um ein genaueres Verstehen der Arbeitsweise des ATPase-Komplexes wurden und werden zwei experimentell unterschiedliche Wege beschritten. Der eine gedankliche Ansatz beruht auf der Sammlung und Interpretation funktioneller Daten, die u. a. über katalytische Aktivität (6), Hemmung (107), Ligenbindung (16, 52), Regulation (100, 128) präzisere Auskunft geben.

Im Zweiten soll durch eine exakte Strukturaufklärung des Enzym-Komplexes und seiner Einzelkomponenten sein Verständnis verbessert werden.

Strukturaufklärung beinhaltet Molekulargewichte, die Aminosäurenzusammensetzung, Sequenzen, α -helikale bzw. β -Faltblattstrukturen, Anzahl und Wechselwirkung der Untereinheiten untereinander bis hin zur genauen Orientierung des Gesamtkomplexes in seiner natürlichen Umgebung, d. h. seine matrix- und/oder cytosolgerichtete Position in der Phospholipid-Doppelschicht.

Dissoziation in Untereinheiten oder Untereinheitenpakete, deren Charakterisierung und (Teil-)Funktionsprüfung sowie die schrittweise Rekonstruktion zum Gesamtkomplex erwiesen sich als geeignete und elegante Methode, die den funktionellen mit dem strukturellen Aspekt verbindet, da sich so die überaus komplexe Funktionsweise

des ATPase-Komplexes am isolierten Modell ungestört von Wechselwirkungen der Organellmembran reproduzieren ließ (23, 68, 71, 99). Isolierung und Charakterisierung von Mutanten der Mikroorganismen *E. coli*, Hefe und des roten Brotschimmels, deren ATPase-Komplex, sei es durch gestörte Biogenese (111), sei es durch verhinderte Protonentranslokation, nicht funktionstüchtig ist (2, 22, 36, 121), trugen ebenfalls dazu bei, das Bild, das heute vom ATPase-Komplex energietransduzierender Membranen existiert, zu vervollständigen.

Seit Pullman et al. 1960 (81) von einer wasserlöslichen ATPase aus Rinderherzmitochondrien berichteten, die nach Isolierung und Anreicherung und an die mitochondriale Membran zurückgebunden, die oxidative Phosphorylierung stimulieren konnte (Kopplungsfaktor F_1 (78)), wurden wie in einem Puzzlespiel Stück für Stück Struktur und Rolle aufgeklärt.

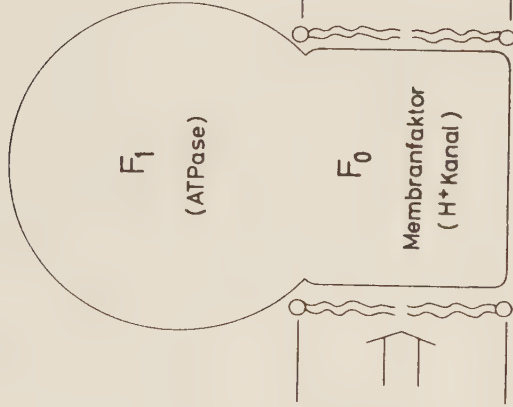
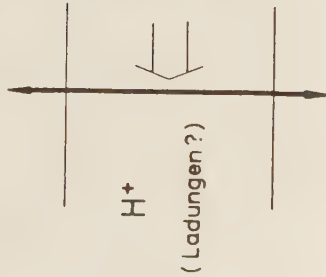
Die Vielfalt der inzwischen bekannten Daten über den ATPase-Komplex aus Bakterien (15, 99), Chloroplasten (79) und Mitochondrien (77, 87, siehe auch Abb. 1) läßt sich wie folgt zusammenfassen (Übersichtsartikel: 77, 87, 98, 116):

1. Das Enzym ist mit der Membran fest verbunden, kann aber mit Hilfe von Detergentien oder Salzen der Gallensäuren in aktiver Form solubilisiert werden.

ATPase KOMPLEX

(Mitochondrien)

Energieübertragendes Enzym



Untereinheiten
(Dalton)

α	55	6000	(2-3)
β	50	5500	(2-3)
γ	30	3600	(1)
δ	12	1500	(1)
ε	8	1200	(1)
Inhibitor		10000	
OSCP		19000	
		19000	(1)
		11000	(1)
		8000	(6)
DCCD - bindendes Protein			

Abb. 1 Schematische Darstellung des mitochondrialen ATPase Komplexes

Der mitochondriale ATPase Komplex hat zwei Aufgaben, die im membranintegrierten Enzym gekoppelt sind:

- 1) die Hydrolyse oder Synthese von ATP
- 2) den Transport von Protonen durch die Membran

Der Transport, ebenso wie die katalytische Aktivität des Gesamtkomplexes, wird durch Oligomycin und DCCD gehemmt. Träger der ATPase- (bzw. ATP-Synthetase) Aktivität ist der F_1 -Anteil. Er besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten, deren Molekulargewichte zwischen 60 000 und 8 000 Dalton liegen, und einem spezifischen Inhibitor mitochondrialer ATPasen. Die beiden größten Untereinheiten liegen in einem stöchiometrischen Verhältnis von (2-3) : 1 im Vergleich zu den kleineren Untereinheiten vor.

Zur Fixierung von F_1 an den Membranteil ist das sogenannte OSCP notwendig.

Der Membranfaktor, dem die Eigenschaft eines H^+ -Kanals zukommt, ist aus mindestens zwei Arten von Untereinheiten zusammengesetzt, darunter das DCCD-bindende Protein, das im Komplex als Oligomer (vermutlich als Hexamer) vorliegt.

2. Es besteht aus zwei Teilen:

- a) einem von der Membran abtrennbaren, wasserlöslichen Teil, der die katalytische Aktivität der ATP-Hydrolyse bzw. ATP-Synthese trägt (F_1 , F_1 -ATPase);
- b) einer mit der Membran fest assoziierten Komponente, die die Protonentranslokation bewerkstelligt und Membransektor, Membranfaktor oder F_0 bezeichnet wird;

Zu a): F_1 -ATPase

Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 300 000 - 360 000 Dalton, lässt sich leicht durch Beschallen (19) oder Harnstoffbehandlung (43) von der Membran ablösen, ist dann im Gegensatz zu dem ATPase-Komplex kältelabil, wasserlöslich, und die ATPase-Aktivität ist mit Oligomycin und DCCD nicht hemmbar (78, 81).

Ein kleines Protein (MW 10 000), das "spezifischer mitochondrialer ATPase-Inhibitor" genannt wird, wird als weitere Untereinheit dem F_1 zugezählt.

Es hemmt spezifisch mitochondriale ATPasen. Während der Isolierung der F_1 -ATPase wird das Protein, abhängig von der Anreicherungsprozedur, teilweise oder ganz entfernt. Der grundsätzliche Aufbau aus ihren Untereinheiten zeigt große Übereinstimmung in allen bisher untersuchten Spezies. Fünf unterschiedliche Untereinheiten (α , β , γ , δ , ϵ) bilden eines der "Köpfchen" mit einem Durchmesser von 9 nm, die elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht wurden, α und β machen 90% des Gesamtproteins aus (47). Aus solchen Untersuchungen sowohl mit dem gelösten Protein (45) als auch mit zwei- (122) und dreidimensionalen (1) Kristallen geht hervor, daß die frontale Projektion der F_1 -ATPase ein hexagonales Molekül mit einem Durchmesser von 9 nm ist. Ebenfalls mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und mit Röntgenstrahlbeugung wurde die F_1 -ATPase als ellipsoid mit den Achsen 12x9x7 nm beschrieben (76, 109). Dabei sollen sechs Proteinmassen in zwei Schichten mit je 3 (α und β) Untereinheiten angeordnet sein (3, 115). Andere Laboratorien (109) berichten von einem sesselartigen Arrangement von sechs Proteinmassen, das einem Cyclohexanmodell ähnelt. Ein Teil des zentralen Raumes wird von einer siebten Proteinmasse eingenommen, möglicherweise die γ -Untereinheit, die mit den anderen Untereinheiten in Kontakt steht (109). Diese Ergebnisse unterstützen die Ansicht, daß - zumindest im Rinderherzprotein - die Untereinheiten in einem stöchiometrischen Verhältnis von 3:3:1:1:1 (α : β : γ : δ : ϵ) vorliegen und daß die einzelnen

Kopien der großen Untereinheiten funktionell nicht gleichwertig sind (3). Die Stöchiometrie der F_1 -Untereinheiten wird jedoch noch unterschiedlich diskutiert (110), auch wenn vieles für die beschriebenen Verhältnisse spricht (7).

Bindungsstudien mit Aurovertin (118) und Rekonstitutionsversuche mit isolierten Untereinheiten (46) aus dem thermophilen Bakterium PS-3 legen den Schluß nahe, daß die β -Untereinheit das katalytische Zentrum der ATP-Hydrolyse trägt, die δ -Untereinheit besitzt Bindungsstellen für festgebundene Adennukleotide (128).

Ebenfalls durch Rekonstitutionsexperimente kamen Yoshida und Mitarbeiter (127) zu der Ansicht, daß $f + \delta + \epsilon$ ein Ventil für den Protonenkanal in der H^+ -ATPase bilden könnten; δ und ϵ sind vermutlich an der Bindung von F_1 an den Membransektor F_0 - über die Untereinheit 6 - beteiligt (105). Chemische Quervernetzung von Untereinheiten des mitochondrialen ATPase-Komplexes aus Hefe, Rinderherz und aus E. coli (17, 49, 111, 112) sowie Trypsinzugänglichkeit der löslichen, verglichen mit der membrangebundenen ATPase (113) geben Hinweise, daß die δ -Untereinheit in direktem Kontakt mit f und F_0 (17, 110), die f -Untereinheit mit ϵ und ϵ mit β (49, 110) steht.

Die so aufgestellten ersten Modellversuche des Enzymkomplexes (112, 113) sind sicherlich vorläufiger Natur, die Arbeitshypothesen darstellen.

Die Aminosäurezusammensetzung von mehreren F_1 -ATPasen und deren Untereinheiten, des Inhibitors und des OSCP ist bekannt (77, 124). Die Primärstruktur von f , ϵ (95) und σ (97) aus Neurospora crassa wurde durch Analyse von cDNA-Clonen der Untereinheiten-mRNA aufgeklärt.

Zu b): F_0 (Membransektor)

Die "intrinsic" Membranproteine des energietransduzierenden ATPase-Komplexes wurden erst in jüngster Zeit isoliert und charakterisiert (21, 22, 24, 48, 69, 105, 106). Befunde aus Rekonstitutionsexperimenten (46, 68, 99), Untersuchungen mit Mutanten (2, 36, 121) und viele andere Hinweise (15) identifizieren F_0 als die direkte protonenleitende Struktur. Auch F_0 ist aus mehreren unterschiedlich großen Untereinheiten zusammengesetzt, deren Zahl aber abhängig von der Spezies deutlich schwankt. Während die Zahl bei Bakterien (21, 105, 106) und Pilzen (72, 87, 112) mit zwei bis drei angegeben wird, soll die Zusammensetzung des Membransektors in Mitochondrien höherer Organismen (Rattenleber, Rinderherz) komplexer sein (28, 29, 56, 65, 84). Die Untereinheiten existieren in mehreren Kopien.

In Hefe werden drei Kopien einer 20 000 Dalton-Untereinheit (Untereinheit 6) und vier Kopien der Untereinheit 9 (MW 7 600) (110) beschrieben. Drei verschiedene hydrophobe Membranproteine bilden F_o in E. coli (a: 24 000 Dalton, b: 19 000 Dalton, c: 8 000 Dalton) (106), deren Stöchiometrie mit 2:2:10 / a:b:c angegeben wird (21). Um einen katalytisch aktiven, DCCD-sensitiven, H^+ -translozierenden ATPase-Komplex aus dem thermophilen Bakterium PS-3 zu rekonstituieren, bedarf es außer der F_1 -Fraktion noch zweier Proteine, eines 13 000 - Dalton - Proteins (2-3 Kopien) und eines 5 400 - Dalton - Proteins (6 Kopien) (45, 105). Eine hexamere Struktur besitzt auch die kleinste Untereinheit aus Neurospora crassa (92), zwei zusätzliche Untereinheiten (MW 19 000, MW 11 000) bilden den kompletten Membransektor (87). Ihre spezifische Anordnung im Membranteil ist noch nicht bekannt, möglicherweise liegen sie als Oligomer-Verbände vor (112).

Betrachtet man die Ergebnisse der Aminosäurezusammensetzung (87, 106) und der Primärstruktur der Membranproteine aus dem E.coli-ATPase-Komplex (21, 24, 48, 69), so überrascht die hohe Polarität der Komponenten a und b (36% und 47%), die vergleichbar ist mit wasserlöslichen Proteinen. Die deutliche Trennung in abgegrenzte hydrophile und hydrophobe Bereiche im Protein b (24) erklärt das überraschende Ergebnis. Diese charakteristische Eigenschaft des Proteins verleitet zur Spekulation, das Protein könnte ein Zwischenglied

zum hydrophilen F_1 -Teil sein, zumal im thermophilen Bakterium PS-3 die F_1 -Bindungsfunktion der Untereinheit 6 (13 000 Dalton) sehr wahrscheinlich ist (105). Seine Beeinflussung oder direkte eventuelle Beteiligung an der H^+ -Translokation geht aus Charakterisierung von E.coli-Mutanten hervor, denen diese Untereinheit fehlt (22).

Andere E.coli-Mutanten, die nicht in der Lage sind, Protonen über die H^+ -ATPase zu transduzieren, haben einen Defekt in der kleinsten F_0 -Untereinheit. Der Austausch einer Aminosäure (Asparaginsäure gegen Glycin) ist für die Störung verantwortlich (36, 121). Neben diesen Ergebnissen beweisen auch Rekonstitutionsversuche (102, 105) eine zentrale direkte Rolle dieses Proteins an der H^+ -Leitung durch den ATPase-Komplex.

Wegen seiner bedeutenden Funktion wuchs das Interesse an ihm ständig, so daß es in den letzten Jahren zu dem am besten beschriebenen Protein des ATPase-Membransektors geworden ist.

Die gemeinsamen Merkmale des aus vielen Organismen isolierten Proteins (13, 14, 20, 26, 58, 92, 101, 104) sind:

- 1) Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, deswegen oft auch Proteolipid genannt, obwohl das Peptid keine feste Bindung mit einem Lipidmolekül eingeht.

- 2) Bindung des Antibioticums Oligomycin (Mitochondrien), Venturicidin.
- 3) Selektive und irreversible Bindung des Hemmstoffes DCCD (DCCD-bindendes Protein) und dadurch Verhinderung des Protonenflusses über die Membran.
- 4) Kovalente Bindung des Hemmstoffes an einen Glutaminsäurerest im mitochondrialen Komplex, an einen Asparaginsäurerest bei E.coli (90).
- 5) Extrem hydrophober Charakter mit Polaritäten von 0.20 bis 0.30, berechnet nach Capaldi et al. (8).
- 6) Vorliegen als Oligomer.

Nach dem Vorliegen zahlreicher Primärstrukturen mit der typischen Aufteilung in hydrophobe und hydrophile Abschnitte (Übersicht 28) wurden Überlegungen über denkbare Sekundärstrukturen (α -helicale Anteile, β -Faltblattstrukturen, "ungeordnetes Knäuel") ebenso wie über die exakte Orientierung des DCCD-bindenden Proteins in der Membran angestellt. Die Anhäufung der wenigen polaren Aminosäuren am N-terminalen Ende der Peptidkette und in der Mitte führte zur Annahme, daß das DCCD-bindende Protein zweimal die Membran durchläuft, wobei seine polaren Seiten mit dem wäßrigen Milieu (d.h. Intermembranraum, Matrix) oder mit anderen Proteinuntereinheiten in Verbindung stehen. Doch lagen bisher keine Untersuchungen zu dieser Frage vor.

In der vorliegenden Arbeit werden Experimente und Ergebnisse beschrieben, die diese Fragen zur Lage und Orientierung des DCCD-bindenden Proteins in der mitochondrialen Phospholipidschicht erhellen sollen. Wegen der spezifischen Aufteilung reagibler Aminosäurereste für Oberflächenreagenzien und Proteasen fiel die Wahl auf das Protein aus Neurospora crassa (siehe Plan).

2. PLAN

Zum Studium der Membrantopologie, mit der speziellen Fragestellung der Zuordnung exponierter Anteile von Proteinkomplexen zu den in der Phospholipidschicht versenkten Anteilen, wurde eine Reihe von Methoden entwickelt. Ihnen liegt der Gedanke zugrunde, daß bestimmte chemisch reaktive Substanzen solche funktionelle Gruppen von Proteinen binden, die zugänglich sind, das heißt:

- a) daß sie sich an der Oberfläche des Proteins befinden, also durch Faltung der Peptidkette oder durch Wechselwirkung mit benachbarten Proteinen bzw. Lipiden nicht abgeschirmt sind,
- b) daß das umgebende Milieu eine Reaktion überhaupt erlaubt; beim Einsatz von Enzymen oder wasserlöslichen Reagenzien müssen die bindenden Gruppen in das hydrophile Milieu des Cytoplasmas bzw. der Matrix hineinragen,
- c) daß die sterischen Parameter der beiden Reaktionspartner eine stabile Bindung erlauben.

Zur Anwendung kommen also Stoffe, die nur in wässriger Umgebung mit Proteinen in Verbindung treten. Es wurden membranintegrierte Proteine auf ihre Zugänglichkeit für Proteasen (10, 42, 80, 126, 130), Antikörper (41), nicht penetrierende Substrate (12) und Effektoren der Enzymaktivität (32) untersucht.

Häufig wurden auch die Laktoperoxidase-katalysierte Iodierung (18, 41, 66, 129) und kleine polare Moleküle, die die Membranen nicht passieren können, sogenannte Oberflächenreagenzien (10, 25, 70, 80, 129, 130), eingesetzt. Umgekehrt binden lipophile Reagenzien solche Gruppen, die an der Oberfläche innerhalb der Membran zu finden sind (65).

Zur Aufklärung der topographischen Lage des DCCD-bindenden Proteins wurden zum einen die Oberflächenreagenzien Dansylchlorid und Diazobenzolsulfonsäure eingesetzt, zum anderen wurde seine proteolytische Zugänglichkeit untersucht.

2.1 Der Einsatz chemischer Oberflächenreagenzien

Mit 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid (Dansylchlorid) wurde eine Substanz gewählt, die unter den gewählten Bedingungen (Zugabe von 10% Aceton) in Wasser löslich ist und in der Phospholipidschicht nicht oder nur geringfügig reagiert. Sie bietet außerdem den Vorteil, daß sich seine Reaktionsprodukte, die dansylierten Aminosäuren, nach Totalhydrolyse des Peptids einfach bestimmen lassen. Die Methode ist durch die Bestimmung N-terminaler Aminosäuren seit langem erprobt (30). Dansylchlorid geht kovalente Bindungen mit Nukleophilen wie primären Amino-, Imidazol-, Sulfhydryl- und phenolischen Gruppen ein (30). (Abb. 2).

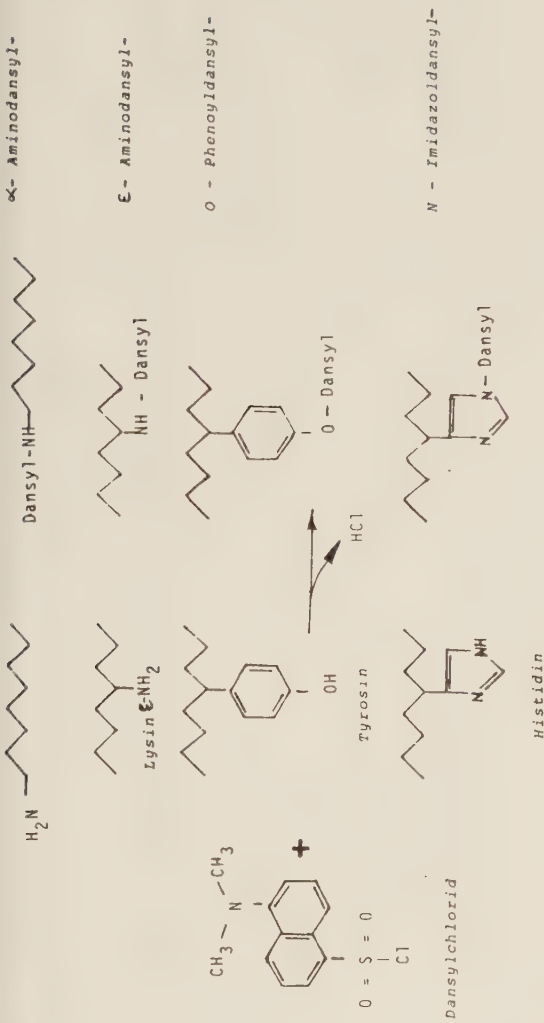


Abb. 2 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid (Dansylchlorid) geht mit Nukleophilen wie α -Amino-, ϵ -Amino-, N-Imidazol- und phenolischen Gruppen von Peptiden stabile Verbindungen ein.

Die Reaktionsschemata mit den entsprechenden Endprodukten veranschaulicht Abb. 2.

Da die Primärstruktur des DCCD-bindenden Proteolipids aus Neurospora crassa Grundlage für die Planung der Experimente war, soll sie an dieser Stelle beschrieben werden. Die im Folgenden gezeigten Experimente werden so besser verständlich. Wie Abb. 3 zu entnehmen ist, besteht das Peptid aus 81 Aminosäuren (93). Die meisten davon sind unpolar und keine Reaktionspartner für Oberflächenreagenzien. Dagegen stellen die N-terminale Aminogruppe, die ϵ -Aminogruppen der Lysine in Position 14 und 79 und die Phenolgruppen der Tyrosine 1 und 56 denkbare Angriffspunkte des Reagenzes dar. Die spezielle Verteilung dieser für die Reagenzbindung in Frage kommenden Aminosäuren in der Peptidkette des DCCD-bindenden Proteolipids ließ eine detaillierte Aussage über seine zugänglichen Anteile erhoffen, da die Methionine so liegen, daß nach Spaltung des Peptids mit Bromcyan, das Peptidbindungen am Carboxylende von Methioninen spaltet, die möglicherweise markierten Aminosäuren in verschiedenen Bromcyanfragmenten zu finden sind (Abb. 4). Dies ist deshalb von Bedeutung, weil - nach chromatographischer Trennung der Spaltprodukte - sich die beiden Lysinreste bzw. Tyrosinreste getrennt beurteilen lassen. Ein weiterer Vorteil der Spaltung und Auftrennung der Produkte ist die exaktere Beurteilung der proteinchemischen Analytik von kleinen Peptiden. Diese Überlegungen führten zu folgendem Plan:

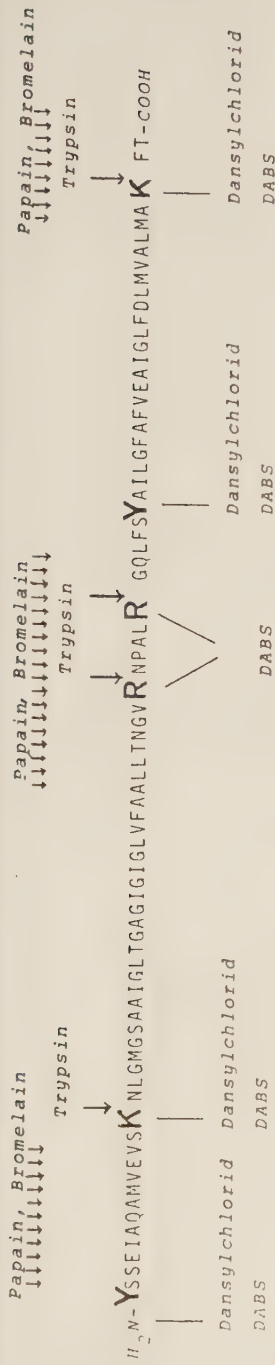


Abb. 3 Die Primärstruktur der DGD-bindenden Proteolipid-Untereinheit des mitochondrialen ATPase Komplexes aus Neurospora crassa und ihre chemischen bzw. enzymatischen Angriffsstellen für "Oberflächenreagenzien" bzw. Proteasen.

Die oberste Zeile gibt die Primärstruktur der Proteolipid-Untereinheit im Einbuchstabencode wieder. Die Übersetzung des Codes findet man im Abschnitt 6.

Darüber zeigen Pfeile die theoretisch möglichen Angriffspunkte von Trypsin an, das Peptidbindungen am Carboxylende basischer Aminosäuren spaltet. Bromelain und Papain hydrolysieren Peptidbindungen unspezifisch. In der Abbildung werden nur solche Bereiche hervorgehoben, die aufgrund von Vorstellungen über die Tertiärstruktur des Proteins denkbar sind.

Darunter markieren vertikale Striche die Angriffsstellen auf Seitenketten des Peptids für die "Oberflächenreagenzien" Dansylchlorid und DABS.

1. Umsetzung des isolierten, durch SDS "entfalteten" Peptids mit Dansylchlorid, um festzustellen, welche Aminosäurereste bei freier Zugänglichkeit das Reagenz binden.
2. Umsetzung des isolierten Peptids in seiner weitgehend nativen Form, um Abschirmeffekte durch seine spezifische Faltung feststellen zu können.
3. Umsetzung des membranintegrierten Peptids, um den Einfluß der unmittelbar benachbarten Phospholipide und Proteinkomplexe auf die Zugänglichkeit zu untersuchen.
4. Umsetzung des membranintegrierten Peptids mit Diazobenzsulfonsäure (DABS), einem rein wasserlöslichen hydrophilen Oberflächenreagenz, das zudem auch stabile Verbindungen mit Argininseitenketten eingeht (33, 39).

2.2 Der Einsatz proteolytischer Enzyme

Die Positionen der möglichen Bindungsstellen für Dansylchlorid sind so verteilt, daß über einen weiten Bereich der Peptidkette keine Aussage über seine Zugänglichkeit für Oberflächenreagenzien möglich ist, denn zwischen Glutamin 15 und Serin 55 (Abb. 3) liegen keine dansylierbaren Seitenketten. Um die topographische Lage dieses Kettenabschnittes zu beurteilen, wurden Proteasen

Bromcyanspaltung der DCCD-bindenden Proteolipid- Untereinheit des mitochondrialen
ATPase Komplexes aus Neurospora crassa

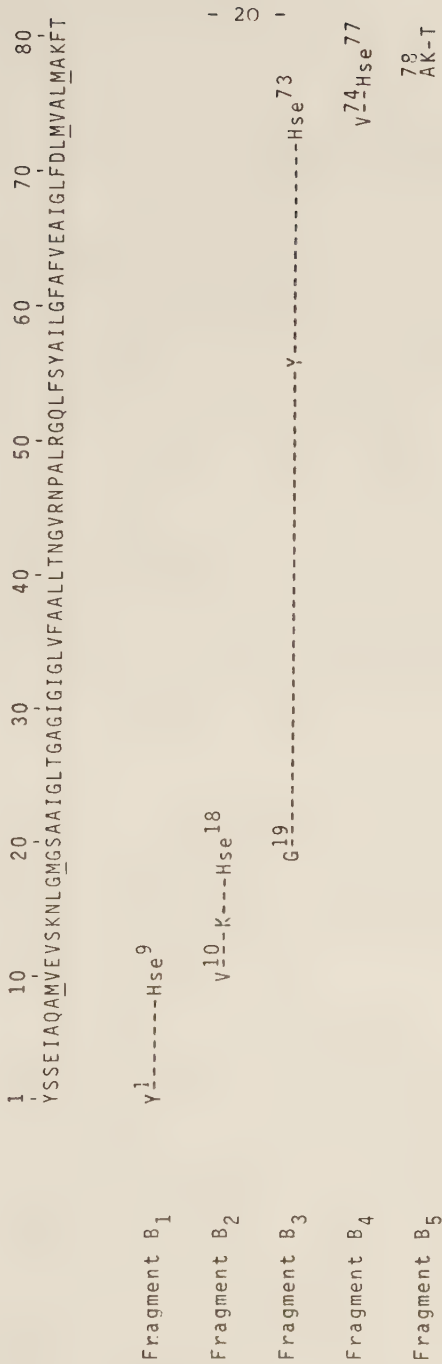
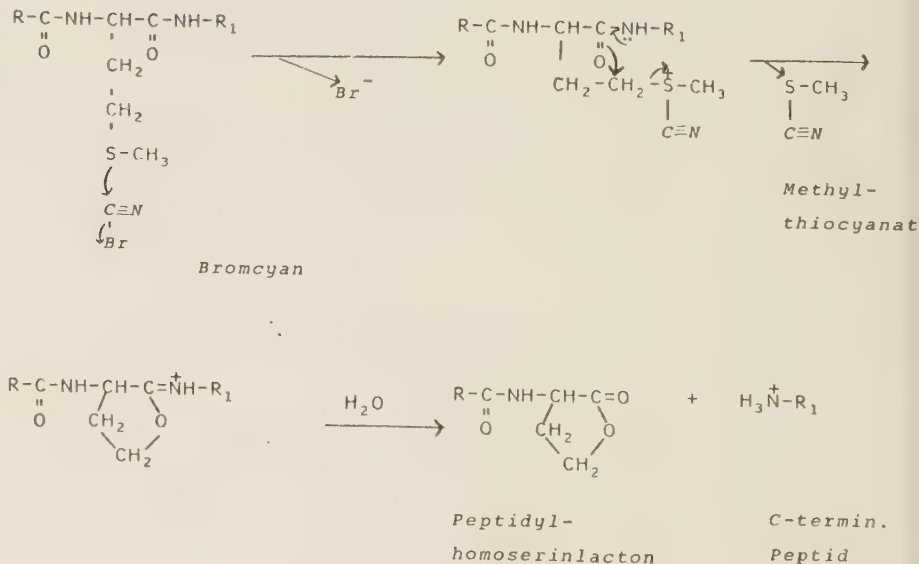


Abb. 4 Bromcyanspaltung der DCCD-bindenden Proteo-
lipid-Untereinheit des mitochondrialen ATPase
Komplexes aus Neurospora crassa

Die oberste Spalte gibt die Aminosäuresequenz
des Proteins im Einbuchstabencode wieder. Die
Übersetzung des Codes ist im Abschnitt 6 zu
finden. Unterstrichen sind die Symbole für
Methionine. Bromcyan spaltet Peptidbindungen
an den Carboxylenden dieser Aminosäuren. Es
entstehen dabei C-terminale Homoserinlacton-
reste (= Hse)



Die darunter liegenden Zeilen symbolisieren
die theoretisch entstandenen Peptide nach
vollständiger Spaltung mit ihren N-, bzw.
C-terminalen Aminosäuren und deren ursprüng-
lichen Position im ungespaltenen Peptid.
Zusätzlich wurden in den Peptidketten die
Aminosäuren hervorgehoben, die potentielle
Reagenzpartner für Dansylchlorid darstellen.

mit unterschiedlicher Spezifität eingesetzt. Zumal dieser Bereich durch einen polaren Abschnitt (Thr 41 - Tyr 56) besonderes Interesse findet. Polare Bereiche sollen in Peptidketten - nach Modellvorstellungen - bevorzugt dem wässrigen Milieu, d. h. dem Cytoplasma und der Oberfläche von gefalteten Ketten, zugewandt sein oder sie sollen Kontaktstellen zu anderen Proteinketten bilden.

Trypsin spaltet Peptidbindungen, wenn die Aminosäure, die die Carboxylgruppe trägt, basisch ist. Das heißt, daß außer den Peptidbindungen Lysin 14 - Glutamin 15 und Lysin 79 - Phenylalanin 80 auch die Bindungen Arginin 45 - Glutamin 46 und Arginin 50 - Glycin 51 für eine tryptische Spaltung in Frage kommen. Diese Bindungen liegen in dem durch Dansylchlorid nicht erfaßten Bereich.

Papain und Bromelain sind Proteasen mit weiterer Spezifität und katalysieren die Totalhydrolyse einer Peptidkette. Durch ihren Einsatz sind alle membranexponierten Teile dem proteolytischen Angriff mehr oder weniger ausgesetzt.

Als Strategie zur Abklärung der Topographie des DCCD-bindenden Proteolipids ergab sich somit die Verwendung dieser Proteasen. Das Ausmaß der Proteolyse sollte nach Umsetzung der Membranen mit dem Enzym und Anreicherung des Proteolipids durch Sequenzanalyse festgestellt werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Oberflächenmarkierungen mit Dansylchlorid

3.1.1. Umsetzung des isolierten in SDS denaturierten Peptids mit Dansylchlorid

Na-Dodecylsulfat (SDS) ist ein häufig verwendetes Denaturierungsmittel, das die Dissoziation von Proteinaggregaten erleichtert. Das Detergens beeinflusst die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen von Proteinen im Sinne einer Auffaltung spezifischer Peptidfaltungen wie z. B. α -helikale Strukturen (108).

Die Bindung des Oberflächenreagens an die durch SDS frei zugänglich gemachten Seitenketten wurden in dem folgenden Experiment untersucht:

4,6 mg ätherpräzipitiertes Proteolipid wurden in 3 ml 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, gelöst und 5 mg Dansylchlorid zugegeben. Nach Lösen des Farbstoffes wurde der Ansatz 3 h bei Raumtemperatur belassen.

Zur detaillierten Analyse der Reganzbindung wurde das markierte Peptid mit BrCN gespalten (0,74 ml 1 M BrCN in 80% Ameisensäure.) und die Spaltprodukte an einem Molekularsieb, Biogel P+30, getrennt



Abb. 5 Trennung der BrCN-Peptide der DCCD-bindenden ATPase-Untereinheit aus Neurospora crassa nach Vorbehandlung mit Dansylchlorid in 2% SDS

4,6 mg Protein wurden mit Dansylchlorid in 2% SDS umgesetzt und danach mit BrCN behandelt, wie es im experimentellen Teil beschrieben ist. Die BrCN-Fragmente (in 0,1 ml 80% Ameisensäure gelöst) wurden über einer Biogel P-30 Säule (-400 mesh) chromatographiert. Säulenmaße: 0,3 x 120 cm, Flußrate: 0,24 ml/h , eine Fraktion $\hat{=}$ 0,8 ml.

Das Diagramm zeigt das Elutionsprofil des Säulenlaufs nach Durchlauf des Eluats durch ein Refraktometer.

— Δ RI

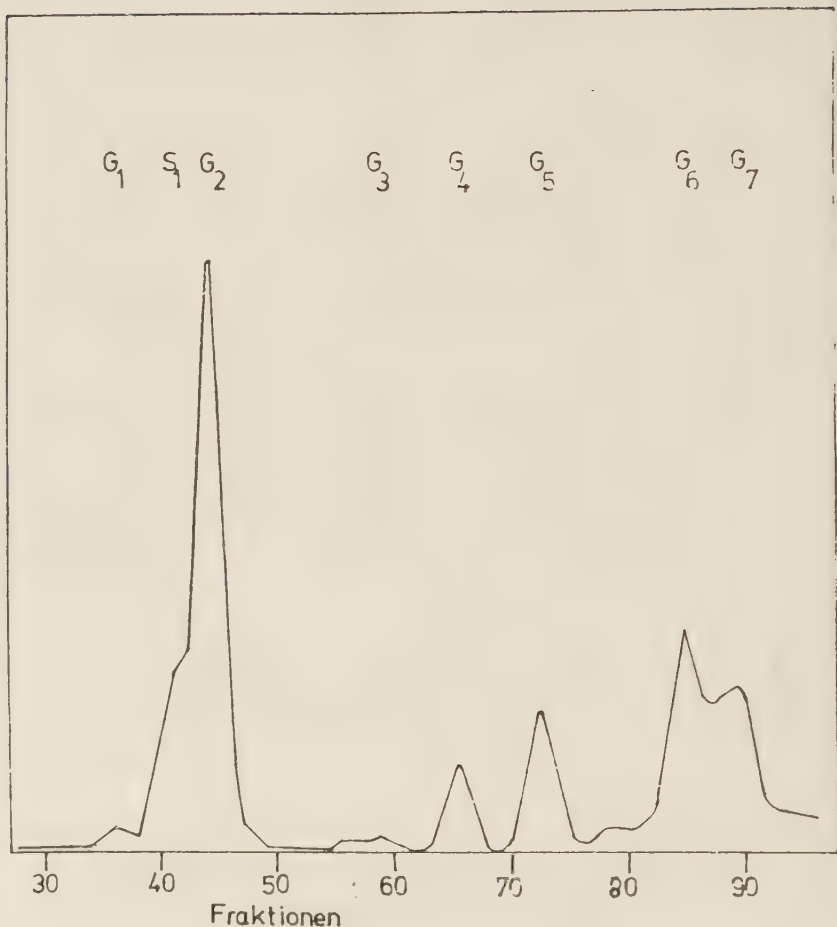


Abb. 6 Chromatographische Trennung der BrCN-Spaltprodukte der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit

4 mg ätherpräzipitiertes Protein wurden mit BrCN umgesetzt wie unter Methoden beschrieben, der eingeeengte Spaltansatz in 0,1 ml 80% Ameisensäure gelöst und über einer Biogel P-30 Säule (-400 mesh) chromatographiert. Säulenmaße: 0,3x120 cm; Flußrate: 0,24 ml/h; eine Fraktion = 0,1 ml.

Das Diagramm zeigt das Elutionsprofil des Säulenlaufes nach Durchlauf des Eluats durch ein Refraktometer.

Abbildung 5 zeigt das Elutionsprofil des Säulenlaufes. Es läßt sich in fünf Abschnitte aufteilen, die mit G I bis G V bezeichnet sind und den einzelnen Gipfeln zugeordnet sind. Von den vereinigten Gipfelfraktionen wurde die Aminosäurezusammensetzung bestimmt, um zu wissen, welche BrCN-Peptide in welchen Fraktionen zu finden sind. Dann wurden nach direkter Hydrolyse jedes Gipfels durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie des Hydrolysats die dansylierten Anteile des Peptids bestimmt. Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren und der Seitenketten des Tyrosins und der Lysine mit Hilfe der Dansyltechnik wurde durchgeführt, um die Zuordnung der einzelnen Gipfel zu BrCN-Fragmenten zu erleichtern. Eine weitere Erleichterung ist der Vergleich mit der Säulenchromatographie der unmarkierten Spaltprodukte (Abb. 6). Die Gipfelfraktionen dieser Chromatographie konnten durch Sequenzanalyse eindeutig den einzelnen BrCN-Fragmenten zugeordnet werden (persönliche Mitteilung E. Wachter):

Schulter 2	(S 2) :	ungespaltenes Peptid	
Gipfel 2	(G 2) :	B 3	Gly 19 - Hse 73
Gipfel 3	(G 3) :	B 1 + 2	Tyr 1 - Hse 18
Gipfel 4	(G 4) :	B 2	Val 10 - Hse 18
Gipfel 5	(G 5) :	B 1	Tyr 1 - Hse 9
		B 5	Ala 78 - Thr 81
Gipfel 6	(G 6) :	B 4	Val 74 - Hse 77
Gipfel 7	(G 7) :	keine Proteinfraction	

Tabelle 1

Tabelle 1

Tabelle 1

Tabelle 1

Der Vergleich des Chromatographieverhaltens und der Aminosäurenzusammensetzungen von Gipfel I (Abb. 5 und Tabelle 1) mit der des unmarkierten Bromcyanpeptids B 3 (Abb. 6) zeigt, daß in diesem Abschnitt der Chromatographie das Peptid B 3 eluiert wurde. Unterstützt wird diese Annahme durch den N-Terminus Glyzin, die Markierung der Phenolgruppe von Tyrosin und das Fehlen von markierten Lysin-Seitenketten. Auf der Dünnschichtplatte mit dem aufgetrennten Hydrolysat der Fraktion G I wurde ein mit dem O-Dansyltyrosin korrespondierender Fleck und in geringem Maße ein ϵ -Aminodansyl-Lysin gefunden. Daraus läßt sich schließen, daß das Tyrosin in Position 56 für Dansylchlorid unter den beschriebenen Bedingungen zugänglich ist. Der geringe Anteil an ϵ -Aminodansyl-Lysin ist nicht spezifisch, da er in der nachdansylierten Fraktion verschwindet.

Die Aminosäureanalysen von Gipfel II (Abb. 5) und die zugehörigen N-Termini lassen eine gute Übereinstimmung mit den Vergleichsdaten der BrCN-Peptide B 1 + 2 und B 4 (Tabelle 1) erkennen. Da in den beiden Peptiden drei mögliche Bindungsstellen für Dansylchlorid vorhanden sind (α -Aminogruppe des Tyrosins, Hydroxylgruppe des Tyrosins, ϵ -Aminogruppe des Lysins; Tabelle 2) müßte bei vollständiger Markierung auf der Dünnschichtplatte des chromatographisch aufgetrennten Hydrolysates ein bis-Dansyltyrosin und ein ϵ -Aminodansyl-Lysin zu finden sein.

Tabelle 2

Markierung des DCCD-bindenden Proteins mit Dansylchlorid in 2% SDS

Gipfel der Säulenchromatographie ⁺	markierte Aminosäuren ⁺	BrCN-Fragmente
Gipfel I ($\approx B_3$)	O-Tyr E-Lys (schwach)	$\begin{array}{c} G^{18} - Y - H^{73} \\ (B_3) \\ \downarrow \\ \star \end{array}$
Gipfel II ($\approx B_{1+2}, B_4$)	L-Tyr bis-Tyr E-Lys	$\begin{array}{c} \star - Y^1 - M - K - Hse^{18} \\ \downarrow \quad \downarrow \\ \star \quad (B_{1+2}) \quad \star \\ V^{74} - Hse^{77} \\ (B_4) \end{array}$
Gipfel III ($\approx B_1, B_2, B_4, B_5$)	L-Tyr E-Lys	$\begin{array}{c} \star - Y^1 - Hse^{73} \\ (B_1) \\ V^{74} - Hse^{77} \\ (B_4) \end{array} \quad \begin{array}{c} V^{10} - K - Hse^{18} \\ \downarrow \\ \star (B_2) \\ A - R - COOH \\ \downarrow \\ ? (B_5) \end{array}$
Gipfel IV ($\approx B_4$)		$V^{74} - Hse^{77} \\ (B_4)$
Gipfel V	keine	

⁺ Abb. 5; Text 3.1.1.

$\star$ symbolisiert das gebundene Reagenz

Neben diesen beiden Aminosäurederivaten wurde noch ein α -Amino-dansyl-Tyrosin gefunden. Das heißt, daß zwar alle drei möglichen Bindungsstellen zugänglich sind, die Hydroxylgruppe des Tyrosins stöchiometrisch aber nicht im gleichen Ausmaß umgesetzt wurde wie die α -Aminogruppe.

Die peptidchemische Analyse der Gipfel III Fraktion liefert auf den ersten Blick ein unübersichtliches Bild. Die Ergebnisse der Nachdansylierung (Tabelle 1) zeigen, daß neben den bereits bekannten N-Termini bis-Tyr ($\cong$ B 1) und Valin ($\cong$ B 2 oder B 4) eine weitere dansylierte Aminosäure, ein Alanin gefunden wurde. Alanin bildet den N-Terminus von B 5. Das Fehlen von O-Dansyltyrosin deutet auf ein Fehlen des großen BrCN-Fragmentes B 3 hin. Sorgfältige Berechnungen der Daten der Aminosäurenanalyse führten zu dem Schluß, daß diese Fraktion ein Peptidgemisch aus B 1, B 2, B 4, B 5 ist. Die Peptide liegen jedoch in unterschiedlichen Mengen vor. Nach Dünnschichtchromatographie der hydrolysierten Probe fand man ein α -Tyr und ein ϵ -Lys (Tabelle 2). Ersteres läßt sich leicht der N-terminalen Aminosäure von B 1 zuordnen. Bemerkenswert ist dabei, daß kein bis-Tyr-Anteil zu finden war. Die Zuordnung des dansylierten Lysins ist nicht eindeutig möglich. Aus der Deutung der Markierungsergebnisse von Gipfel II wissen wir, daß das Lysin 14 aus B 2 markiert wurde. Ob nun auch das Lysin 79 aus B 5 für Dansylchlorid zugänglich ist, kann aus diesen Ergebnissen nicht

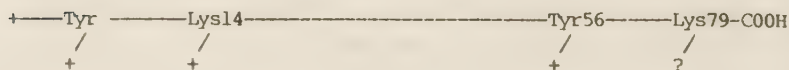
geschlossen werden, da diese Säulenchromatographie die beiden lysinhaltigen Peptide B 5 und B 2 nicht auftrennte.

Im Gipfel IV wurde das BrCN-Fragment B 4 eluiert. Dies zeigt eindeutig die Aminosäurenanalyse und das Ergebnis der Nachdansylierung (Tabelle 1). Da dieses Peptid keine "dansylreaktive" Seitenkette trägt, kann über seine Zugänglichkeit keine Aussage gemacht werden.

Alle peptidchemischen Daten zeigen, daß die Fraktion Gipfel V keine Proteinfraction war. Sie enthielt u. a. Dansylsäure, das Hydrolyseprodukt des Dansylchlorids.

Die Ergebnisse dieses Experimentes lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Unter den Bedingungen der Kettenentfaltung durch SDS (2%) werden die Aminosäuren Tyrosin 1, Lysin 14 und Tyrosin 56 markiert. Über die Markierung am Lysin 79 ist keine Aussage möglich.



3.1.2. Umsetzung der isolierten Proteolipid-Untereinheit mit Dansylchlorid in Chloroform/Methanol/Wasser

Wegen seines ausgeprägt hydrophoben Charakters, die Polarität nach der Definition von Capaldi et al. (8) beträgt 0,25, ist die DCCD-bindende Proteolipid-Untereinheit des ATPase-Komplexes in wässrigem Milieu praktisch nicht löslich. In organischen Lösungsmitteln wie Chloroform und Methanol löst sich das Proteolipid jedoch ohne Schwierigkeiten. Ein Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser (3:3:1, v.v.v) hat sich als Extraktions- und Lösungsmittel bewährt (23). Im Extrakt sind Protein und Lipide gelöst. Da sich das Protein unter diesen Bedingungen fällen und wieder lösen läßt, darf man annehmen, daß es sich in seinem weitgehend nativen Zustand befindet. Ob der native Zustand einen Abschirmeffekt auf die reagenzbindenden Gruppen ausübt, wurde im folgenden Experiment untersucht.

Im Ansatz befanden sich 4,6 mg Protein, gelöst in 3 ml Chloroform/Methanol/10 mM Tris-HCl, pH 8,5, und 4 mg Dansylchlorid. Den Ansatz ließ man 3 1/2 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das ätherpräzipitierte Protein über Nacht mit BrCN behandelt, wie es unter Methoden (4. 8.) beschrieben ist.

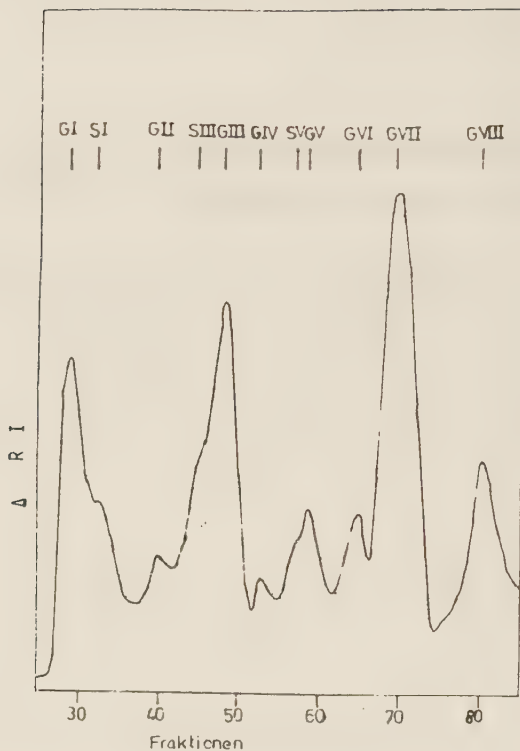


Abb. 7 Trennung der BrCN-Fragmente des DCCD-bindenden Proteolipids nach Markierung mit Dansylchlorid in C/M/W 3:3:1

4,6 mg Protein wurden mit Dansylchlorid in Chloroform/Methanol/Wasser (3:3:1; v:v:v) umgesetzt und danach mit BrCN behandelt, wie es unter Methoden beschrieben ist. Die BrCN-Fragmente wurden in 0,25 ml 80% Ameisensäure gelöst und über einer Biogel P-30 Säule (-400 mesh) chromatographiert. Säulenmaße: 0,5 x 120 cm; Flußrate: 630 µl/h; eine Fraktion $\hat{=}$ 210 µl.

Das Diagramm zeigt das Elutionsprofil des Säulenlaufes nach Durchlauf des Eluats durch ein Refraktometer.

Die Spaltprodukte wurden durch eine Säulenchromatographie (Biogel P - 30, - 400 mesh, in 80% Ameisensäure) getrennt. Im Elutionsdiagramm (Abbildung 7) sieht man acht Gipfel (G I bis G VIII), die Gipfel I und III mit Schulter (S I und S III). Von den vereinigten Gipfelfractionen der einzelnen Abschnitte wurde, wie im vorangehenden Experiment, das direkte Hydrolysat und ein nachdansyliertes Aliquot auf markierte Aminosäuren untersucht. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.

Um die Frage zu beantworten, welche Fragmente in welchem Gipfel eluiert wurden, können das Elutionsvolumen (Größe der Peptide) und die N-terminalen Aminosäuren herangezogen werden. So läßt sich schließen, daß sich in der Fraktion "S III" Peptide größer als das BrCN-Peptid B 3 befinden, da sie vor diesem eluiert wurden. Die N-Termini bis-Tyr, Val, Gly und das O-dansylierte Tyrosin lassen vermuten, daß es sich um das ungespaltene Proteolipid (bis-Tyr) und die Überlappungspeptide B 2 + 3 + 4 + 5 (Val) sowie B 3 + 4 + 5 (Gly) handelt.

Gipfel III ist gekennzeichnet durch die N-terminale Aminosäure Glycin und durch das Monoderivat O-Tyr in der nachdansylierten Probe. Daraus läßt sich schließen, daß diese Probe mit dem BrCN-Peptid B 3 identisch ist. Bemerkenswerterweise wurde im direkten Hydrolysat keine markierte Aminosäure bestimmt.

Tabelle 3

Markierung der BrCN-Fragmente des DCCD-bindenden Proteins - Umsetzung des isolierten Proteins in CMW 3:3:1

Gipfel der Säulen- chromatographie	direktes Hydrolysat	nachdansyliertes Hydrolysat
Gipfel I	ϵ -Lys (schwach)	ϵ -Lys (schwach)
Schulter I	ϵ -Lys (schwach)	ϵ -Lys O-Tyr (schwach)
Gipfel II	Thr ϵ -Lys	Thr ϵ -Lys O-Tyr
Schulter III	α -Tyr ϵ -Lys	bis-Tyr Val Gly ϵ -Lys O-Tyr
Gipfel III		Gly O-Tyr bis-Tyr (Spur)
Gipfel IV	ϵ -Lys	ϵ -Lys O-Tyr
Schulter V	ϵ -Lys	bis-Tyr
Gipfel V	ϵ -Lys	ϵ -Lys
Gipfel VI	ϵ -Lys	Val ϵ -Lys
Gipfel VII	α -Tyr	bis-Tyr Ala ϵ -Lys
Gipfel VIII	—	—

Die Tyrosinseitenkette des Tyrosins 56 wurde also nicht markiert.

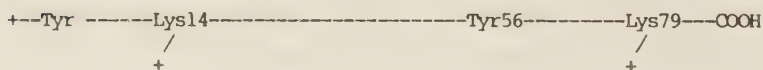
Schulter und Gipfel V werden zusammengefaßt, da beide Proben die gleichen Ergebnisse liefern. Diese Probe dürfte das Überlappungspeptid B 1 + 2 sein, denn das Fragment hat nur einen N-Terminus (bis-Tyr) und enthält ein Lysin (ϵ -Lys). In Frage kommt nur der N-terminale Abschnitt des Proteolipids Tyr 1 - Hse 18, der in der Säulenchromatographie der unmarkierten Spaltstücke an dieser Stelle eluiert wurde (Abbildung 6). Im direkten Hydrolysat wurden die Dansylderivate α -Tyr und ϵ -Lys gefunden. Es wurden also wie in dem Markierungsexperiment in SDS die α -Aminogruppe des N-Terminus und die Lysinseitenkette des Lysin 14 markiert.

Ein N-terminales Valin, ein Lysin als Kettenglied und eine Größe, die das 200 Dalton-Peptid von Gipfel V unterschreitet, sind die Charakteristika der Peptidfraktion Gipfel VI. Sie treffen alle auf das Nonapeptid B 2 (Val 10 - Hse 18) zu. Es überrascht nicht, daß in der direkten Hydrolyse ein ϵ -Lys gefunden wurde, denn bereits in Gipfel V haben wir gesehen, daß Lysin 14 markiert wurde.

Nahe dem hinteren Ausschlußvolumen zeigt das Elutionsprofil einen hohen Absorptionsgipfel (G VII). Die Nachdansylierung der vereinigten Gipfelfractionen ergab bis-Tyr und Alanin als N-Termini. Außerdem enthält die Fraktion ein Lysin.

Alanin ist die N-terminale Aminosäure von B 5 (Ala 78 - Thr 81), bis-Tyr von B 1 (Tyr 1 - Hse 9). Die Untersuchung der Gipfel-VII-Fraktion auf primär dansylierte Aminosäuren ergab ein α -Tyr und ϵ -Lys (Tabelle 3). Da B 1 kein Lysin enthält, wohl aber B 5, muß die markierte Seitenkette letzterem zugeordnet werden.

Die Umsetzung der isolierten Proteolipid-Untereinheit in nativem Zustand führt also zur Markierung der α -Aminogruppe von Tyr 1, der ϵ -Aminogruppe von Lys 14 und der ϵ -Aminogruppe von Lys 79:



3.1.3. Umsetzung submitochondrialer Partikel mit Dansylchlorid

Die natürliche Lage der DCCD-bindenden Untereinheit in dem Enzymkomplex und dessen Einbettung in die mitochondriale Innenmembran kommt den in-vivo Verhältnissen sehr nahe. Neben den Phospholipiden der Membran und den Proteinuntereinheiten der ATPase können auch andere Proteinkomplexe der mitochondrialen Innenmembran abschirmend für Oberflächenreagenzien wirken. Welche der reagiblen Gruppen durch solche Effekte für Dansylchlorid nicht mehr zugänglich ist, wurde untersucht, indem Mitochondrien in Gegenwart des Reagenz beschallt wurden. Durch die Beschallung werden die Membranen in kleine Trümmer zerschlagen. Es bilden sich Vesikel, deren Wand aus mitochondrialer Innenmembran besteht, wobei meist die Matrixseite nach außen zeigt (82). Da die Mitochondrien in Gegenwart des Reagenz beschallt wurden, sind die Membranvesikel beidseitig vom Marker umgeben.

Im Experiment wurden frisch präparierte Mitochondrien aus Hyphen von Neurospora crassa in 0,44 M Saccharose, 2 mM-EDTA, 10 mM Tra-HCl, pH 8,2 suspendiert (10 mg Protein/ml). Die Suspension wurde mit einer Dansylchloridlösung (16 mg/ml Aceton) versetzt, so daß der Ansatz 10% an Aceton war. Unter diesen Bedingungen blieb die ATPase-Aktivität der Membranfraktion über eine Stunde stabil und war durch Oligomycin hemmbar (unveröffentlichte Experimente).

Dann wurde die Suspension 1 min beschallt, kurz geschüttelt und 3 min nachbeschallt, dann wurde 30 min bei 37°C geschüttelt (siehe auch Methoden 4.5.1.2). Aus dieser Membranfraktion wurde die Proteolipid-Untereinheit angereichert, BrCN gespalten und die Fragmente über einem Molekularsieb getrennt. Die einzelnen Fragmente wurden mit den gleichen peptidchemischen Methoden analysiert wie in den vorangegangenen Untersuchungsreihen.

In der Beschreibung der Ergebnisse beschränken wir uns, wie in den vorangegangenen Kapiteln, auf die Abschnitte der Säulenchromatographie, die eine eindeutige Zuordnung zu BrCN-Fragmenten des DCCD-bindenden Proteins zulassen. Das sind Gipfel II, Gipfel V und Gipfel VI (Abbildung 8, Tabelle 4). Das Elutionsvolumen, ein Vergleich mit dem Säulenlauf der unmarkierten Spaltstücke (Abbildung 6), die Aminosäurezusammensetzung und die N-Termini sowie der Vergleich mit den Elutionsprofilen der vorangegangenen Untersuchungsreihen zeigen, daß in Gipfel II das BrCN-Peptid B 3, in Gipfel V das Fragment B 2, und in Gipfel VI die beiden BrCN-Peptide B 1 und B 5 eluiert wurden.

Die Ergebnisse der Oberflächenmarkierung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Neben schwachen und unspezifischen Markierungen der übrigen Abschnitte wurde im Abschnitt G VI (B 1, B 5) eine starke und deutliche Markierung des Tyrosins an der α -Aminogruppe gefunden (Tabelle 5).

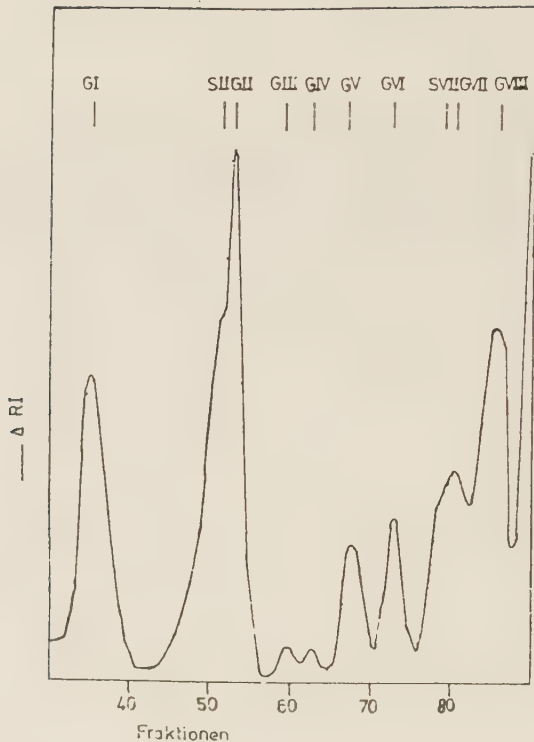


Abb. 8 Trennung von BrCN-Fragmenten der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit des mitochondrialen ATPase Komplexes aus Neurospora crassa nach Dansylierung von submitochondrialen Partikeln

Nach Umsetzung submitochondrialer Partikel mit Dansylchlorid wurde die DCCD-bindende Untereinheit angereichert und mit BrCN behandelt (siehe dazu Methoden). Die Trennung der BrCN-Fragmente, 2mg gelöst in 0,2 ml 80% Ameisensäure, erfolgte über eine Biogel P-30 Säule in 80% Ameisensäure. Säulenmaße: 0,5 x 150 cm, Flußrate 0,4 ml/h, eine Fraktion $\approx$ 0,2 ml.

Die Abbildung zeigt das Elutionsprofil nach Durchlauf des Eluats durch ein Refraktometer.

Tabelle 4

B₁CN-Fragmente des DCCD-bindenden Proteins - Markierung submitochondrialer Partikel

Protein- fraktion [†]	GI	SII	GII B ₃ ^O	.GIII	GIV	GV B ₂ ^O	GVI B ₁ ^O B ₅	SVII	GVII
	Mol / Mol Peptid								
Asx	5,7	4,0	3,2	3	1,2	1,0	0,4	0,3	-
Thr	3,7	2,6	1,5	1	0,8	0,4	1,0	0,2	-
Ser	7,3	4,3	2,2	2	1,2	1,0	2,0	0,5	-
Hse	-	0,4	1,3	1	0,5	1,0	1,4	1,0	-
Glx	5,5	4,3	2,4	2	1,2	1,0	2,4	0,4	-
Pro	n.b.	n.b.	1,1	1	-	-	-	-	-
Gly	8,6	6,1	9,4	10	1,5	1,2	0,7	0,5	-
Ala	7,1	6,6	10,3	10	1,7	0,8	3,1	1,2	-
Val	5,3	3,6	3,7	3	1,0	1,6	0,4	1,0	-
Ile	5,3	2,8	5,9	5	0,8	0,2	1,1	-	-
Leu	8,9	6,3	8,1	9	1,5	1,1	0,4	1,0	-
Tyr	2,9	1,7	1,1	1	0,5	0,2	1,0	-	-
Phe	5,3	2,9	4,6	5	0,8	0,3	1,1	0,2	-
His	-	0,7	0,4	-	0,3	0,2	0,1	-	-
Lys	3,6	2,7	0,7	-	1,0	0,9	1,1	0,1	-
Arg	2,0	2,8	2,0	2	0,7	0,2	0,2	0,1	-
dansyl- Amino- säure	0-Tyr	bisTyr (schwach) ε-Lys	Gly Val Ala	bisTyr ε-Lys	bisTyr ε-Lys	Val Gly ε-Lys	bisTyr Ala ε-Lys	Val Ala ε-Lys (schwach)	

[†] GI - GVII : Kennzeichnung der Gipfel in Abb. 8 und im Text 3.1.3.
O aus der Literatur (93) bekannte Aminosäurezusammensetzung

Tabelle 5

Markierung des DCCD-bindenden Proteins - Umsetzung submitochondrialer Partikel mit Dansylchlorid

Gipfel der Säulenchromatographie ⁺	markierte Aminosäuren ⁺	BrCN-Fragmente ^o
Gipfel I	—	unspezifisch
Schulter II	—	unspezifisch
Gipfel II	Gly, Ser, ϵ -Lys (schwach)	G19 — Y — Hse ⁷³ (B ₃)
Gipfel III	Val, Glu, ϵ -Lys (schwach)	unspezifisch
Gipfel IV	α -Tyr, ϵ -Lys (schwach)	unspezifisch
Gipfel V	ϵ -Lys (schwach)	V10 — K — Hse ¹⁸ (B ₂)
		?
Gipfel VI	α -Tyr (sehr stark)	Y1 — — — Hse ⁹ (B ₁)
		*
Schulter VII	—	A78 — — — T-COOH (B ₅)
Gipfel VII	—	unspezifisch

⁺ siehe Abb. 8 und Text 3.1.3.

^o siehe Tab. 4 und Text 3.1.3.

* symbolisiert das gebundene Reagenz

3.1.4. Umsetzung intakter Mitochondrien mit Dansylchlorid

Die Proteinkomplexe der mitochondrialen Innenmembran sind asymmetrisch angeordnet, so daß sie eine der Außenmembran zugewandte Seite besitzen, die sich von einer "Matrix-Seite" unterscheidet (11). Im Markierungsexperiment mit submitochondrialen Partikeln sind die Membranen beidseitig von dem Oberflächenreagenz umgeben, intakte Mitochondrien aber nur von der Außenseite; vorausgesetzt die Membran ist für das Reagenz impermeabel. Durch Vergleich beider Untersuchungsergebnisse kann die spezifische Markierung einer Seite festgestellt werden.

Zur Durchführung des Experimentes wurden frisch präparierte Mitochondrien (10 mg Protein/ml in SETra, pH 8,2) mit einer Dansylchloridlösung (16 mg/ml Aceton) versetzt. Die Suspension, die 10% Aceton enthielt, wurde 30 min bei 37°C geschüttelt. Dann wurde das DCCD-bindende Protein angereichert und mit BrCN gespalten. Die Spaltprodukte wurden chromatographisch getrennt und peptidchemisch analysiert.

Der Spaltansatz wurde in der Biogel P-30-Chromatographie in fünf Gipfeln eluiert (G I bis G V in Abbildung 9). Die Aminosäurezusammensetzung von Gipfel I korreliert gut mit der des BrCN-Peptids B 3 (Gly 19 - Hse 73).



Abb. 9 Trennung von BrCN-Fragmenten der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit des mitochondrialen ATPase Komplexes aus *Neurospora crassa* nach Markierung von Mitochondrien mit Dansylchlorid

Nach Umsetzung frisch präparierter Mitochondrien mit Dansylchlorid wurde die DCCD-bindende Untereinheit des ATPase Komplexes angereichert und mit BrCN behandelt (siehe dazu Methoden). Die Trennung der BrCN-Fragmente (2-3 mg in 0,125 ml 80% Ameisensäure) erfolgte über eine Biogel P-30 Säule in 80% Ameisensäure. Säulenmaße: 0,4x150 cm; Flußrate: 0,4 ml/h; eine Fraktion $\cong$ 0,2 ml.

Die Abbildung zeigt das Elutionsprofil nach Durchlauf des Eluats durch ein Refraktometer.

Die niedrigen Werte der hydrophoben Aminosäuren können auf eine relativ kurze Hydrolysedauer (20 min bei 160 °C) zurückgeführt werden. Glycin als N-terminale Aminosäure (Tabelle 6) und die O-Dansylmarkierung des Tyrosins sprechen ebenfalls für das BrCN-Fragment B 3. Das Auftreten von Dans-Val zeigt ein geringfügiges Vorliegen des Überlappungspeptids B 2 und B 3. Die chromatographische Auftrennung des Hydrolysats der Fraktion ergab schwache nicht einzuordnende Fluoreszenzflecke.

Die peptidchemischen Daten von Gipfel II decken sich am besten mit denen des Fragmentes B 1 + 2. Primär markiert wurde in dieser Fraktion die α -Aminogruppe des Tyrosins (Tabelle 7).

Vergleicht man die Aminosäurezusammensetzung und das Nachdansylierungsergebnis von Gipfel III (Tabelle 6) mit dem BrCN-Peptid B 2 (Val 10 - Hse 18), stimmen die Daten gut überein. Die schwache primäre Markierung der α -Aminogruppe des Tyrosins (Tabelle 7) deutet auf einen geringen Anteil von B 1 hin.

In Gipfel IV wurden die BrCN-Fragmente B 1 und B 5 eluiert. Die Dansylderivate bis-Dansyltyrosin, α -Aminodansyl-Alanin und ϵ -Aminodansyl-Lysin geben ein klares Bild. Das direkte Hydrolysat enthält α -Aminodansyl-Tyrosin. Gipfel V enthält keine spezifischen Fragmente.

Die Oberflächenmarkierung intakter Mitochondrien mit Dansyl-chlorid führt also zu der alleinigen Markierung der N-terminalen α -Aminogruppe.

Tabelle 6

Aminosäurezusammensetzung der BrCN-Fragmente des DCCD-bindenden Proteins -
Markierung von Mitochondrien

Protein- fraktion +	GI	B ₃ ^O	GII	B ₁₊₂ ^O	GIII	B ₂ ^O	GIV	B _{1,B₅} ^O	GV
Mol / Mol Peptid									
Asx	3,1	3	1,1	1	0,9	1	0,7	-	-
Thr	1,3	1	0,5	-	0,4	-	0,9	-	-
Ser	2,5	2	2,0	3	1,0	1	2,3	2	-
Hse	1,1	1	0,9	1	0,9	1	1,5	2	-
Glx	2,3	2	1,9	3	0,9	1	2,3	2	-
Pro	1,5	1	0,8	-	0,3	-	0,4	-	-
Gly	7,9	10	1,6	1	1,1	1	1,0	-	-
Ala	8,6	10	2,2	2	1,0	-	3,3	3	-
Val	2,7	3	1,9	2	2,1	2	n.b.	-	-
Ile	3,5	5	0,9	1	0,2	-	1,1	1	-
Leu	6,7	9	1,2	1	1,0	1	0,7	-	-
Tyr	0,4	1	0,7	1	0,1	-	0,3	1	-
Phe	3,4	5	0,5	-	0,4	-	0,8	1	-
Lys	0,7	-	1,0	1	1,0	1	1,1	1	-
Arg	1,6	2	0,2	-	0,1	-	0,1	-	-
dansyl- Amino- säure	Gly Val (schwach)	Gly O-Tyr	bisTyr ε-Lys	bisTyr ε-Lys	Val ε-Lys	Val ε-Lys	bisTyr Ala	bisTyr Ala	Ala Ser ε-Lys

+ GI - GV : Kennzeichnung der Gipfel in Abb. 9 und im Text 3.1.4.
O aus der Literatur (93) bekannte Aminosäurezusammensetzung und die theoretisch zu erwartenden Dansylderivate

Tabelle 7

Markierung des DCCD-bindenden Proteins - Umsetzung ganzer Mitochondrien mit Dansylchlorid

Gipfel der Säulenchromatographie ⁺	markierte Aminosäuren ⁺	BrCN-Fragmente ^o
Gipfel I		$G^{19}-Y-Hse^{73}(B_3)$
Gipfel II	α -Tyr	$Y^1-K-Hse^{18}(B_{1+2})$ *
Gipfel III	α -Tyr (schwach)	$V^{10}-K-Hse^{18}(B_2)$ *
Gipfel IV	α -Tyr (sehr stark)	$V^1-Hse^9(B_1)$ *
Gipfel V	—	$A^{78}-K-T^{81}-COOH(B_5)$

⁺ siehe Abb. 9, Text 3.1.4.

^o siehe Text 3.1.4.

* symbolisiert das gebundene Reagenz

3.2. Der Einsatz proteolytischer Enzyme

3.2.1. Proteolytische Verdauung submitochondrialer Partikel mit Trypsin

Trypsin hat, bedingt durch seine Spezifität, theoretisch nur vier Möglichkeiten der Spaltung (Lys 14, Arg 45, Arg 50 und Lys 79). Würde an einem oder beiden Argininen tryptisch gespalten werden, müßte die Peptidkette in etwa zwei gleich große Hälften mit ca. 40 Aminosäuren geteilt sein. Erfolgte die Spaltung am Lysin 14, resultierten Spaltprodukte von den Größen 14 Aminosäuren und 67 Aminosäuren. Im Falle eines tryptischen Angriffs am Lysin 79 wäre eine Fraktion von der annähernden Größe der ungespaltenen Kette und ein Dipeptid zu erwarten.

Nach Anreicherung der Proteolipidfraktion mit Chloroform/Methanol erfolgte die Trennung der Spaltprodukte durch Säulenchromatographie. Als Molekularsieb diente Biogel P - 30, - 400 mesh in 80% Ameisensäure. Das fraktionierte Eluat wurde peptidchemisch (Aminosäurezusammensetzung und N-Termini) untersucht.

Die säulenchromatographische Trennung der Proteolipidfraktion nach Behandlung der Membranen (SMP) mit Trypsin (siehe unter 4.6.1.) zeigt Abbildung 10:

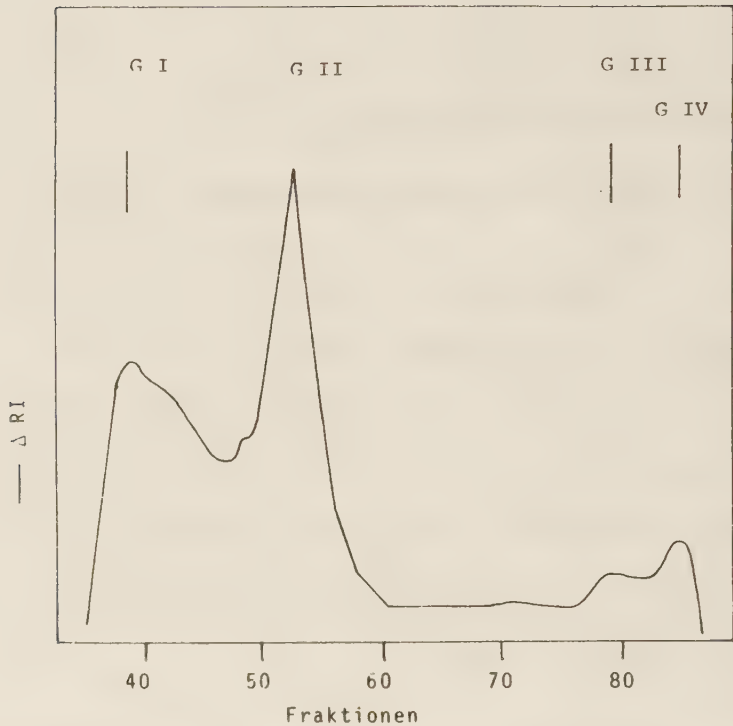


Abb.10 Biogel P-30 Chromatographie der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit nach Trypsin-Behandlung submitochondrialer Partikel aus Neurospora crassa

Submitochondriale Partikel wurden mit Trypsin umgesetzt, danach die DCCD-bindende ATPase Untereinheit mit Chloroform/Methanol extrahiert und angereichert wie unter Methoden beschrieben.

2 mg der gereinigten und ätherpräzipitierten Proteinfractionen wurden in 0,1 ml 80% Ameisensäure gelöst und über Biogel P-30 (-400 mesh) chromatographiert.

Die Säulenmaße betrugen 0,5 x 120 cm, Flußrate 0,63 ml/h, eine Fraktion $\hat{=}$ 0,21 ml.

Das Diagramm zeigt das Elutionsprofil nach Durchlauf durch das Refraktometer.

Der aufgetragene Spaltansatz wurde im wesentlichen in zwei Gipfeln eluiert. Der erste nahe dem Ausschlußvolumen (Fraktionen 33 - 44, Gipfel I), der zweite deutlich vom ersten abgesetzt gleich danach (Fraktionen 46 - 56), Gipfel II). Beide Gipfel machen zusammen fast das gesamte vom Refraktometer registrierte Material aus.

Nahe dem hinteren Ausschlußvolumen wurden zwei kleinere Gipfel eluiert. (Fraktionen 76-82 $\hat{=}$ GIII, Fraktionen 84-88 $\hat{=}$ G IV).

Bestimmung der N-terminalen Aminosäure und Aminosäurezusammensetzung (Tabelle 8) zeigen, daß Gipfel I nicht dem DCCD-bindenden Proteolipid zugeordnet werden kann. Gipfel II jedoch läßt sich eindeutig als die ungespaltene Untereinheit des ATPase-Komplexes identifizieren. Gipfel III und IV und die vereinigten Fraktionen des hinteren Ausschlusses, in denen man kleine Fragmente vermuten konnte, enthielten keine für die Proteolipid-Untereinheit charakteristischen Spaltpeptide.

Das bedeutet, daß nach Trypsin-Behandlung mitochondrialer Membranen nur das ungespaltene Proteolipid extrahiert worden war.

Tabelle 8

Aminosäurenzusammensetzung der Proteolipidfraktionen nach tryptischer Behandlung von mitochondrialen Membranen (SMP) und Trennung durch Biogel P-30 Gelchromatographie

vereinigte Gipfelfrac.	PL ²	G	I	II	III	IV
Mol / 100 Mol						
Asparaginsäure	5	8,5	5,2	6,8	4,1	
Threonin	2,5	4,5	3,1	5,3	4,7	
Serin	6,3	15,8	6,2	11,5	10,8	
Glutaminsäure	6,3	6,0	6,0	7,4	5,4	
Prolin	1,2	1,3	0,8	2,1	3,1	
Glycin	13,8	11,2	14,2	15,7	8,4	
Alanin	17,5	10,7	18,0	9,7	18,0	
Cystein	—	—	—	—	—	
Valin	7,5	n.b.	7,7	5,5	10,0	
MSO+MSN ¹	5,0	n.b.	6,5	0,9	2,6	
Isoleucin	7,5	4,5	6,0	3,0	7,0	
Leucin	13,8	9,4	11,8	6,1	16,3	
Tyrosin	2,5	5,0	2,3	2,6	2,0	
Phenylalanin	7,5	5,1	6,3	3,5	4,8	
Histidin	—	—	—	—	—	
Tryptophan	—	—	—	—	—	
Lysin	2,5	4,5	2,9	13,9	1,6	
Arginin	2,5	2,3	2,8	15,7	1,1	
N-terminale Aminosäure	Tyr	Ser	Tyr	Lys	—	

1 MSO:Methioninsulfoxid
MSN:Methioninsulfonsäure

2 PL:DCCD-bindendes Proteolipid

3.2.2. Proteolytische Verdauung ganzer Mitochondrien mit Papain und Bromelain.

In Analogie zu den Experimenten von Ovchinikov et al. (74) mit Purpurmembranen aus Halobacterium halobium wurden Mitochondrien aus Neurospora crassa mit Papain bzw. Bromelain unter milden Bedingungen ($0,2 \mu\text{Mol}$ bzw. $2 \mu\text{Mol}$ Enzym/g mitochon. Protein) proteolytisch anverdaut. Die Reaktionszeit betrug 20 h, die Temperatur war 37°C . Danach wurde die Proteolipidfraktion in der üblichen Weise angereichert (Methoden 4.2.).

Die Aminosäurezusammensetzung der vereinigten Gipfelfractionen (Tabelle 9) ergab einen erniedrigten Serin-, Glutaminsäure-, Glycin- und Alaninanteil. Da am N-terminalen Ende des DCCD-bindenden Proteolipids die Aminosäuren Serin, Glutaminsäure und Alanin zu finden sind, wäre eine mögliche Erklärung für den niedrigen Gehalt die proteolytische Verdauung des N-Terminus.

Die Frage der N-terminalen Teilproteolyse wurde durch Sequenzanalyse der angereicherten Proteolipidfraktion geklärt. Dazu wurde das Peptid über seine Lysin-Seitenketten an einen festen Träger (DITC-Glas) gebunden und die Aminosäurenfolge bestimmt:

Y S S E I A Q A M V E V S N K

Diese Sequenz ist mit der N-terminalen Sequenz des ungespaltenen Proteins identisch. Das Ergebnis zeigt somit eindeutig, daß durch die Papain- bzw. Bromelainbehandlung die Peptidkette der DCCD-bindenden ATPase-Untereinheit - wenn überhaupt - nur schwach angegriffen worden ist.

Tabelle 9

Aminosäurezusammensetzung der DCCD-bindenden Proteo-lipid-Untereinheit des mitochondrialen ATPase Komplexes, isoliert aus proteolytisch angedauten Mitochondrien mit Papain und Bromelain

Vorbehandlung	Papain	unbehandelt	Bromelain
Mol / 100 Mol Peptid			
Asparaginsäure	4,9	5,0	5,6
Threonin	3,6	2,5	4,0
Serin	4,5	6,3	5,6
Glutaminsäure	4,6	6,3	5,9
Prolin	n.b.	1,2	n.b.
Glycin	10,8	13,8	12,3
Alanin	13,2	17,5	14,8
Cystein	—	—	—
Valin	9,5	7,5	8,8
MSO + MSN ¹	2,7	5,0	2,0
Isoleucin	10,4	7,5	8,5
Leucin	17,7	13,8	15,4
Tyrosin	2,7	2,5	2,5
Phenylalanin	9,7	7,5	8,2
Lysin	2,8	2,5	3,1
Arginin	2,9	2,5	3,2

1 MSO: *Methioninsulfoxid*

MSN: *Methioninsulfonsäure*

3.2.3. ^{35}S - DABS Markierung des mitochondrialen ATPase-Komplexes

Aus den bisher gewonnenen Ergebnissen ist zu schließen, daß im membranintegrierten Enzymkomplex nur die N-terminale Aminosäure exponiert ist. Die Amphibiennatur des Dansylchlorids (partiell lipophil) könnte eine Markierung der α -Aminogruppe des Tyrosin 1 an der Wasser-Lipidschicht der Membran erklären. Ein rein hydrophiles Oberflächenreagenz würde dann vermutlich nicht reagieren. Die Experimente, die die Zugänglichkeit des hydrophilen Abschnittes von Arginin 45 bis Arginin 49 klären sollen (Einsatz von Trypsin), waren mit erheblichen methodischen Schwierigkeiten belastet, so daß sie nur eingeschränkt beurteilbar sind. Oberflächenmarker, die auch an die Guanidinogruppen des Arginins binden, wären zur Prüfung einer Exposition zusätzlich geeignet.

Mit Diazobenzsulfonsäure (DABS) wurde eine Verbindung eingesetzt, die beide Eigenschaften vereinigt. Der experimentelle Ansatz war jedoch zu den vorangegangenen Versuchen grundsätzlich verschieden. Nicht die markierten Aminosäurenderivate im isolierten DCCD-bindenden Protein wurden identifiziert, sondern die spezifische radioaktive ^{35}S - DABS Bindung an die Proteolipid-Untereinheit im immunpräzipitierten ATPase-Komplex.

Dazu wurden ^3H - Leucin - markierte Mitochondrien (Proteinmarker) oder submitochondriale Partikel mit ^{35}S - DABS umgesetzt, in

Triton - X - 100 solubilisiert und der mitochondriale ATPase-Komplex mit spezifischen Antikörpern gegen F₁ aus der gelösten Membranproteinfraktion gefällt. Die Identifikation der DCCD-bindenden Untereinheit im ATPase-Komplex war durch Vergleich mit DCCD-Bindungsstudien aus anderen Versuchen möglich (92). Durch ihren hohen Leucingehalt und ihre bekannte Laufgeschwindigkeit in der SDS-Gelelektrophorese kann sie leicht als kleinste Bande im aufgetrennten Immunpräzipitat ausgemacht werden (siehe Abb. 11 u. 12).

Diese Diagramme zeigen eindeutig, daß mit dieser Peptidfraktion keine ³⁵S - DABS Radioaktivität gewandert ist. Das gilt sowohl für das Präzipitat aus markierten Mitochondrien wie submitochondrialen Partikeln.

Damit wurde gezeigt, daß das DCCD-bindende Protein in Neurospora grassa im membranintegrierten ATPase-Komplex keine für DABS reaktive Gruppe exponiert.

Quantitative Berechnungen der ³⁵S - DABS Bindung an das DCCD-bindende Protein auf der Basis der spezifischen Radioaktivitäten beider Reaktionspartner haben ergeben, daß selbst bei Bindung von nur 0.01 Mol DABS pro Mol Proteinuntereinheit eine deutliche spezifische ³⁵S - Radioaktivitätsanreicherung hätte gemessen werden müssen.

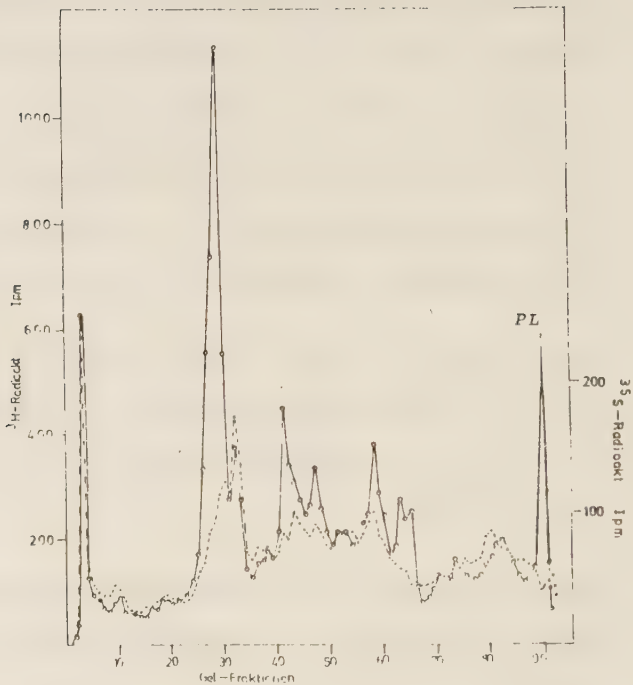


Abb. 11 Verteilung der ^3H -Leucin-Markierung (o-o) und der ^{35}S -Radioaktivität (●-●) im immunpräzipitierten ATPase Komplex

Immunpräzipitat aus solubilisierten submitochondrialen Partikeln

^3H -Leu-markierte submitochondriale Partikel wurden isoliert und mit ^{35}S -DARS umgesetzt wie unter Methoden beschrieben. Der immunpräzipitierte Enzymkomplex wurde in einer SDS-Gelelektrophorese in seine Untereinheiten getrennt und die Radioaktivitätsverteilung bestimmt. PL = DCCD-bindendes Protein

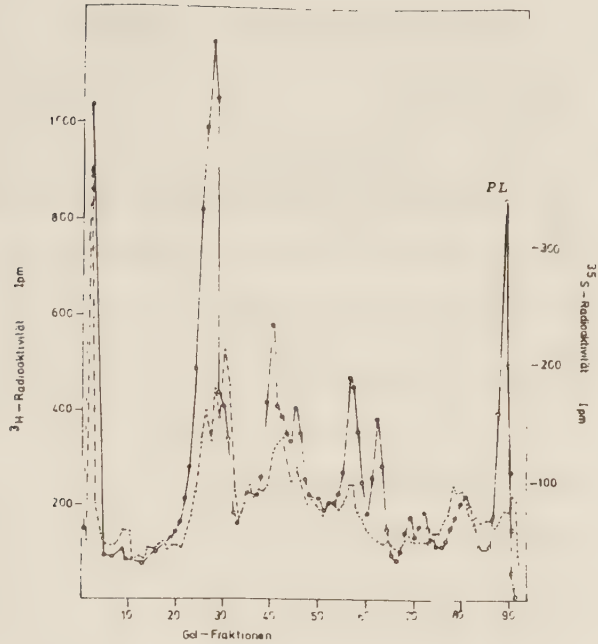


Abb.12 Verteilung der ^3H -Leucin-Markierung (o—o) und der ^{35}S -Radioaktivität (●---●) im immunpräzipitierten ATPase Komplex

Immunpräzipitat aus solubilisierten Mitochondrien

^3H -Leucin-markierte Mitochondrien wurden isoliert und mit ^{35}S -DABS umgesetzt wie unter Methoden beschrieben. Der immunpräzipitierte Enzymkomplex wurde in einer SDS-Gelelektrophorese in seine Untereinheiten getrennt und die Radioaktivitätsverteilung bestimmt. PL = DCCD-bindendes Protein

4. MATERIALIEN UND METHODEN

4.1. Zellfraktionen aus Neurospora crassa

4.1.1. Zellkultur

Konidien von Neurospora crassa (Wildtyp 74 A) wurden in Vogels Minimalmedium (120) unter sterilen Bedingungen inkubiert (2×10^6 Konidien/ml). Bei einer Temperatur von 25° C ließ man den Schimmelpilz unter ständiger Belüftung 18 h lang wachsen. Unter diesen Bedingungen ist gerade das Ende der logarithmischen Wachstumsphase erreicht.

4.1.2. ³H-Markierung der Hyphen

Um eine homogene Markierung der Zellproteine zu erreichen, wurde nach 15 h Wachstum ³H-Leucin (5 mCi/8 l) zu der wachsenden Kultur gegeben. Nach 3 h Inkubation wurden die Hyphen geerntet, die bei Zugabe der oben angegebenen Leucinmenge eine spezifische Aktivität von 178 000 Ipm/mg Protein hatten.

4.1.3. Präparation von Mitochondrien (91)

Die abzentrifugierten oder abgesaugten Hyphen (Ausbeute: ca. 10 g Feuchtgewicht pro Liter Zuchtmedium) wurden in 6 Volumen Isolationsmedium (bezogen auf Feuchtgewicht w/v) in einem BRAUN-Küchenmixer

homogenisiert. Das Isolationsmedium bestand aus: 0,25 M Saccharose, 2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF. Nach einer von Weiss et al. beschriebenen Methode (123) wurden die Zellwände des Hyphenhomogenats in einer Mühle zerrieben und 10 min bei 1 500 x g in einer Sorvallzentrifuge mit dem Rotortyp SS 34 oder GSA abzentrifugiert. Die hellbeigen Überstände wurden 30 min bei 10 800 x g (GSA 60 min bei 10 400) zentrifugiert, die Pellets dieser Zentrifugation zur Reinigung in Isolationsmedium resuspendiert und 10 min bei 1 500 x g zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden durch 20 minütige Zentrifugation bei 17 000 x g aus den Pellets gewonnen, die in wenig Puffermedium (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-Azetat, pH 7,2) aufgenommen wurden (Proteinkonzentration: 20 mg/ml). Waren die Mitochondrien Ausgangsmaterial für die Markierung mit Dansylchlorid, bestand das Isolationsmedium aus 0,44 M Saccharose, 2mM EDTA, 10 mM Tra-HCl, pH 8,2.

4.1.4. Präparation von submitochondrialen Partikeln

Zur Herstellung submitochondrialer Partikel wurde die Mitochondrien-suspension (10 - 15 mg Protein/ml) dreimal 1 min unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier, Modell S-75, Stufe 8). Danach wurde 60 min bei 165 000 x g zentrifugiert (Ultrazentrifuge Beckmann Spinco L-2, Rotortyp Ti 50). Die Partikel wurden, abhängig vom Experiment, in 10 mM Tris, pH 7,5, 10 mM Tra, pH 8,2 oder pH 8,5, suspendiert und bei -20°C gelagert.

4.2. Anreicherung der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit (86)

Durch Zentrifugation gewonnene Sedimente von Mitochondrien oder sub-mitochondrialen Partikeln wurden dreimal mit Chlorform-Methanol-Diäthyläther (2:1:12; v/v/v) bei 0°C gewaschen. Ein Milliliter der organischen Lösungsmittel wurde für 2 bis 10 mg Protein verwendet. Dann wurden die Proteinsedimente 30 min in neutralem Chloroform-Methanol (2:1; v/v) bei Raumtemperatur inkubiert. Den Rückstand, der durch Zentrifugation erhalten wurde, extrahierte man ein zweites Mal mit Chloroform/Methanol. Zu den vereinigten Extrakten wurde das vierfache Volumen Diäthyläther gegeben. Das präzipitierte Protein wurde durch Zentrifugation gewonnen und erneut in Chloroform/Methanol gelöst. Unlösliche Rückstände wurden verworfen. Die Fällung wurde dreimal wiederholt.

4.3. Immunpräzipitation des ATPase-Komplexes

Die Fl-ATPase des Komplexes wurde durch Chloroformbehandlung von Mitochondrien in Lösung gebracht (5). Das gereinigte Fl-Protein wurde dann zur Gewinnung von Antikörpern in Kaninchen verwendet. Der gesamte ATPase-Komplex wurde mit Hilfe des Antiserums gegen Fl aus Triton X-100 solubilisierten SMP (oder Mitochondrien) gewonnen (74).

4.3.1. Herstellung des Antigens (5)

Alle Arbeitsvorgänge wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Mitochondrien wurden in TEA (10 mg Protein pro ml) und dem gleichen Volumen Chloroform vorsichtig geschüttelt, bis eine homogene Emulsion entstanden war. Nach Zentrifugation bei 10 000 x g (10 min) wurde die gelblich trübe Wasserphase durch eine weitere Zentrifugation (20 000 x g, 15 min) geklärt. Die Chloroformphase und die unlösliche Zwischenphase wurden verworfen. Der klare Überstand wurde sofort auf eine DEAE-Cellulose-Säule (20 g DEAE pro 3 g Mitochondrien), äquilibriert mit TEA, aufgetragen. Die Säule wurde zuerst mit TEA und dann mit TEA, 30 mM KCl, gewaschen, bis sämtliches braunes Material entfernt war. Die das Fl enthaltende Fraktion wurde als gelbe Bande mit TEA, 0,3 M KCl, eluiert. Das eluierte Protein wurde durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat (50 g pro 100 ml) präzipitiert und dann in einem kleinen Volumen TEA (30-40 mg Protein/ml)

aufgenommen. Nach Abzentrifugieren der Trübung ($20\,000 \times g$, 5 min) wurde die Lösung auf eine Biogel A-0,5 m Säule (5 cm x 150 cm), äquiliбриert mit TEA, aufgetragen. Die Säulenchromatographie wurde bei einer Flußrate von 30 - 40 ml pro Stunde durchgeführt. Die eluierten Proteinfractionen wurden bei 280 nm registriert. Das Fl-Protein wurde in ca. 100 ml kurz nach dem vorderen Ausschlußvolumen eluiert. Die aktiven Fractionen wurde vereinigt und die Fl-ATPase mit festem Ammoniumsulfat (50 g / 100 ml) ausgefällt. Die Suspension wurde bei 0°C gelagert.

4.3.2. Gewinnung des Antiserums

2 mg Protein in 0,2 mM¹50 ml Tris-Azetat, pH 7,5, wurden in 1 ml Freud's complete adjuvans emulgiert. Die Emulsion wurde einem Kaninchen an 4 Stellen am Rücken subkutan gespritzt. Dieser Vorgang wurde alle 9 Tage wiederholt. Nach etwa 6 Wochen wurde der Titer durch Titration bestimmt (gefällte 3H-Leucin-Radioakt.).

Dem Kaninchen wurde 50 - 100 ml Blut abgenommen. Das Blut ließ man ca. 6 h bei Raumtemperatur stehen. Danach zentrifugierte man den geronnenen Blutkuchen ab und fror Aliquots des Serums ein. Das Serum ließ sich ohne Beeinträchtigung seiner Wirkung bei - 18°C lagern.

4.3.3. Immunpräzipitation

Bei einer Temperatur von $0 - 4^{\circ}\text{C}$ wurden die Mitochondrien (bzw. SMP) auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml in 10 mM Trisazetat, 1 % T X - 100, pH 7,5, gebracht und durch das Detergenz solubiliert. In einigen Experimenten enthielt die Suspension 0,3 M KCl. Der Niederschlag aus der Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (5 min) wurde verworfen; im Überstand befanden sich 95 - 100 % des gesamten mitochondrialen Proteins. Überstand und Antiserum wurden in dem in der Titertitration bestimmten Verhältnis bei 0°C 2 h inkubiert, dann wurde in der Tischzentrifuge für 5 min zentrifugiert, das sich im Niederschlag befindliche Immunpräzipitat einmal mit 1 ml 10 mM Trisazetat (0,3 M KCl, je nach Experiment) 1 % T X - 100, pH 7,5, gewaschen, u. U. wurde mit dem gleichen Puffer ohne Triton nachgewaschen und in wenig (50 - 100 μl) 10 mM Trisazetat, pH 7,5, aufgenommen. Wird die Immunpräzipitation mit KCl durchgeführt, ist die Ausbeute geringer.

4.4. Oberflächenmarkierung des ATPase-Komplexes mit 35S-DABS

4.4.1. Herstellung der 35S-Diazobenzolsulfonsäure

Die Diazotierung der 35S-p-Aminobenzolsulfonsäure (auch als Sulfanilsäure bekannt) wurde nach der von Hoyer und Trebold (40) beschriebenen, indirekten Methode durchgeführt:

7 mg 35S-Sulfanilsäure (40 μ Mol; 54 mCi/mMol) wurden in 40 μ l 1 N NaOH und 120 μ l 0,37 M NaCl gelöst und Verunreinigungen abzentrifugiert (2 min, Tischzentrifuge). Nach Abkühlen auf Eisbadtemperatur wurde 160 μ l 1 N HCl zur Gewährleistung eines Säureüberschusses und 80 μ l 0,55 M NaNO₂ (43 μ Mol), das die Nitrosogruppe liefert, zugegeben und 45 min im Eisbad inkubiert. 5 μ l 0,36 M Amidoschwefelsäure beendeten die Reaktion durch Entfernen des überschüssigen Nitrits. Die weißen Kristalle der Diazoverbindung wurden abzentrifugiert, in 1 ml 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, gelöst und Aliquots eingefroren.

Die Fähigkeit zur Azokupplung wurde durch die Bildung eines kirschroten Farbstoffes nachgewiesen, der durch die Reaktion von 5 μ l des Reagenz mit 0,1 ml 1 mM Tyrosinlösung bei pH 9 entsteht. Zusätzlich wurden die löslichen Proteine Serumalbumin vom Rind und Lactoglobulin mit DABS umgesetzt und die gebundene Radioaktivität festgestellt. 32S-DABS wurde auf die gleiche Weise hergestellt.

4.4.2. Zählausbeute und Halbwertszeit von 35S-DABS

Vom Hersteller wurden 2.2 mCi 35S-Sulfanilsäure mit einer spez. Radioaktivität von 54 mCi/mMol geliefert. Daraus ergibt sich eine Gesamtzahl an Zerfällen von 488×10^7 pro Minute. Nach der oben beschriebenen Diazotierung wurden aus Überstand und Lösung der

Diazoverbindung eine Gesamtzahl von 232×10^7 Impulse pro Minute im Packard-Tricarb-Scintillator ausgezählt. Der Quotient, gebildet aus beiden Werten, ergibt die Zählausbeute: 47,5 % (Fehler ± 10 %).

Das ^{35}S -Isotop des Schwefels hat eine Halbwertszeit von 88 Tagen. Dieser rasche Zerfall mußte bei Betrachtung der Radioaktivitätsverteilung in den einzelnen Markierungsversuchen berücksichtigt und bei der quantitativen Auswertung mit Hilfe des Zerfallsgesetzes $N = N_0 \times e^{-kt}$ korrigiert werden.

4.4.3. Azokopplung des membranintegrierten ATPase-Komplexes

Die Azokopplung mit Mitochondrien und submitochondrialer Partikel wurde bei 0°C für 4 h in folgendem Reaktionsgemisch durchgeführt: 2 mg Mitochondrien (bzw. SMP) in 0,25 M Saccharose, 20 mM PO_4 , 1 mM EDTA, 475 nMol ^{35}S -DABS. Die Reaktion wurde durch extensive Dialyse gegen 0,25 M Saccharose, 100 mM Trisazetat, pH 7,0, beendet. Dazu wurde die 2-ml-Probe gegen 2 l Dialyseflüssigkeit mit Wechsel nach 30 min dialysiert. Die kurze Dialysierzeit konnte gewählt werden, nachdem ein Versuch gezeigt hatte, daß nach 20 min 85 % des freien DABS aus der Probe entfernt war.

4.5. Oberflächenmarkierung mit Dansylchlorid

4.5.1. Umsetzung der isolierten Proteolipid-Untereinheit

4.5.1.1. Umsetzung in 2 % SDS

4.6 mg ätherpräzipitiertes Protein wurden in 3 ml 2 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, gelöst und 5 mg Dansylchlorid zugegeben. Nach Lösen des Farbstoffes wurde der Ansatz 3 h bei Raumtemperatur belassen und anschließend im Rotationsverdampfer eingetrocknet. Der Rückstand wurde danach in 80 % Ameisensäure aufgenommen und mit BrCN gespalten, wie unter 4.8 beschrieben.

4.5.1.2. Umsetzung der isolierten Proteolipid-Untereinheit in Chloroform-Methanol-Wasser (3:3:1, v/v/v)

4.6 mg ätherpräzipitiertes Protein wurde in 3 ml Chloroform/Methanol/10 mM Tris-HCl, pH 8,5 (3:3:1, v/v/v) gelöst; der Ansatz enthielt zusätzlich 4 mg Dansylchlorid und wurde 3,5 h bei Raumtemperatur belassen. Zur Abtrennung der wässrigen Komponente wurde zuerst soviel Chloroform und Pufferlösung zugegeben, daß ein Verhältnis Chloroform/Methanol/Wasser von 8:4:3 erreicht wurde. Nach Zentrifugation bei 2 200 x g hatten sich dann zwei vollständig getrennte Phasen gebildet. Die obere wässrige Phase wurde verworfen, die untere organische Phase, die das Protein enthielt, mit 5fachem Volumen Diäthyläther versetzt, das dann sofort ausfiel.

Das Ätherpräzipitat wurde in 80 % Ameisensäure aufgenommen und mit BrCN gespalten, wie unter 4.8. beschrieben.

4.5.2. Umsetzung der membranintegrierten Proteolipid-Untereinheit

In Saccharose-Medium SETra (0,44 M Saccharose, 2 mM EDTA, 10 mM Tra-HCl, pH 8,1) suspendierte Mitochondrien (5 mg Protein/ml) wurden mit acetonischer Dansylchloridlösung (2 mg/ml) versetzt, daß die Lösung 10%ig in Bezug auf das Aceton war. Der Ansatz wurde 30 min bei 35°C belassen. Nach Zentrifugation wurde das zwei- bis dreimal gewaschene Proteinsediment mit Chloroform-Methanol-Äther behandelt, wie unter 4.2. beschrieben und die Proteolipid-Untereinheit extrahiert.

Sollten submitochondriale Partikel umgesetzt werden, wurden die Mitochondrien mit Dansylchlorid versetzt, wie oben beschrieben. Anschließend wurde die Suspension dreimal 1 min mit Ultraschall behandelt und 30 min bei 35°C belassen. Danach wurde 60 min bei 165 000 x g zentrifugiert. Die Sedimente wurden mit Chloroform-Methanol-Äther behandelt, wie unter 4.2. beschrieben.

4.6. Proteolytische Behandlung mitochondrialer Membranen

4.6.1. Verdauung mit Trypsin

In Pufferlösung (10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA) suspendierte submitochondriale Partikel (10 mg Protein/ml) wurden über acht Stunden bei 30°C mit Trypsin (30 µg/10 mg Protein) behandelt, dann bei 165 000 x g durch Zentrifugation präzipitiert. Die Sedimente wurden in Chloroform/Methanol aufgenommen und die DCCD-bindende Proteolipid-Untereinheit angereichert, wie unter 4.2. beschrieben.

4.6.2. Proteolytische Verdauung ganzer Mitochondrien mit Papain und Bromelain

Frisch präparierte Mitochondrien (ohne PMSF-Zusatz) wurden mit Bromelain (2 µMol Enzym/g mitochondriales Protein) und mit Papain (0,2 µMol Enzym/g mitochondriales Protein) proteolytisch angedaut. Die Reaktionszeit betrug 20 Stunden, die Temperatur 37°C. Danach wurde die Proteolipidfraktion in der üblichen Weise angereichert (siehe 4.2.).

4.7. P-30 Gel-Chromatographie

Proteolipidpräparationen aus proteolytisch vorbehandelten mitochondrialen Membranfraktionen sowie Spaltansätze der BrCN-Spaltungen wurden über Bio-Gel P-30, - 400 mesh, chromatographiert:

0,1 bis 0,2 ml einer Proteinprobe in 80 % Ameisensäure (1 - 5 mg Protein/ml) wurden auf die Säule, äquilibriert in 80 % Ameisensäure, aufgetragen. Die Säulenmaße variierten zwischen 0,3 cm x 120 cm und 0,4 cm x 150 cm. Die Flußrate betrug - je nach Säulengröße - 0,2 bis 0,6 ml/h. Das Absorptionsverhalten des Eluates bei 280 nm und sein relativer Brechungsindex, gemessen in einem Refraktometer, wurden registriert.

4.8. BrCN-Spaltung (125)

0,2 - 0,5 μ Mol ätherpräzipitiertes Protein wurden in 400 - 800 μ l einer 1 M BrCN-Lösung in 80 % Ameisensäure gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Spaltansatz wurde anschließend bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingeeengt, zweimal in 80 % Ameisensäure aufgenommen und wieder eingetrocknet. Nach Lösen in 0,1 - 0,2 ml 80 % Ameisensäure wurde die Probe auf der P-30-Säule chromatographiert.

4.9. Bestimmung dansyliertter Aminosäuren (30)

Ca. ein Drittel der vereinigten Gipfelfractionen aus den Bio-Gel-P-30-Chromatographien wurden in einseitig zugeschmolzenen Glasröhrchen eintrocknet. Der Rückstand wurde mit 10 μ l 0,2 M CaHCO_3 alkalisch gemacht und wieder eintrocknet. Anschließend wurde die Probe mit 2 x 10 μ l Dansylchlorid (2 mg/ml in Aceton:Wasser 1:1) versetzt, 10 bis 20 min bei 37°C gehalten und zur Trockene eingengt. In 50 μ l 5,7 N HCl wurde dann 8 bis 10 h bei 105°C hydrolysiert. Das eingetrocknete Hydrolysat wurde zur Identifizierung in 10 μ l 95 % Äthanol aufgenommen und 1 - 3 μ l auf beidseitig beschichteten Polyamidplatten (5 cm x 5 cm) aufgetragen. Die Chromatographie wurde in folgenden Laufmitteln ausgeführt:

Laufmittel I: 1,5%ige HCOOH

dann senkrecht dazu

Laufmittel II: Benzol/Eisessig (10:1, v/v)

in der gleichen Laufrichtung wie II

Laufmittel III: Essigsäureäthylester/Methanol/
Eisessig (20:1:1, v/v/v).

Die Identifizierung der dansylierten Aminosäure erfolgte unter einer UV-Lampe (350 nm) anhand eines auf der Rückseite der Platten chromatographierten Vergleichstandards aus dansylierten Aminosäuren.

4.10. Aminosäurenanalyse

Ca. ein Drittel der vereinigten Gipfelfractionen aus den Bio-Gel P-30 Gel-Chromatographien wurden in einem abgeschmolzenen Glasröhrchen eingetrocknet und in 200 μ l 5,7 N HCl bei 105°C 24 bis 120 h hydrolysiert. Das eingetrocknete Hydrolysat wurde in einem Citratpuffer (Na-Citrat pH 2,4) aufgenommen und in einem Durrum-Analysator analysiert.

4.11. Sonstige analytische Methoden

4.11.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Lowry et al. (55) durchgeführt. Die Proteinproben wurden entweder in 2 % Dodecylsulfat oder in 80 % Ameisensäure, die anschließend mit 5 N NaOH neutralisiert wurde, gelöst. Als Standard diente Serumalbumin vom Rind.

4.11.2. SDS-Polyacrylamid - Gelelektrophorese (85)

Zur Herstellung der Plattengele wurde eine wässrige Lösung aus 10 % Acrylamid, 0,3 % Methylenbisacrylamid, Tetramethyläthylen-diamin (1 ml/l) und Ammoniumperoxodisulfat (1 g/l) hergestellt und in Gelschablonen (130 x 200 x 3 mm) polymerisiert. Die Gele wurden 48 h mit einem SDS-Medium (0,5 % SDS, 0,1 M Tris-Azetat, pH 8), das auch als Elektrodenpuffer diente, äquilibriert. Die Proteinprobe wurde in einem 2 % SDS-Puffer gelöst (2 % SDS, 0,1 M Tris-Azetat, 5 % Mercaptoäthanol, pH 8). Die Elektrophorese wurde zuerst mit 30 mA (1 - 2 h), dann mit 60 mA betrieben. Sie war beendet, wenn Cytochrom c etwa 6 cm gelaufen war.

Die Gele wurden 12 h mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt (2,5 g/l in Methanol/Wasser/Essigsäure 5:5:1, v/v/v). Als Entfärberlösung diente 10 % Essigsäure, anschließend Methanol/Wasser/Essigsäure (5:5:1, v/v/v).

4.11.3. Radioaktivitätsmessungen

Die Proteinproben wurden direkt - oder gelöst in 0,5 ml Dodecylsulfat (0,1 M Tris-Azetat, 1 % Dodecylsulfat, pH 8) - in Scintillationsgläschen überführt, die 15 ml Scintillationsflüssigkeit enthielten (6 g PBD in 400 ml Äthylenglycol-monomethyläther und 600 ml Toluol). Die Messung erfolgte in einem Packard-Tricarb-Scintillationszähler.

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung nach SDS-Gel-Elektrophorese wurden vor der Messung im Scintillationszähler die Gele in 1 x 10 mm dicke Scheiben geschnitten, jedes Scheibchen in 0,5 ml SDS-Puffer (wie oben) gegeben und das Protein über Nacht bei 60°C eluiert.

4.12. Verwendete Materialien

35S-Sulfanilsäure (54 mCi/mMol) 3H-Leucin: Radiochemical Centre, Amersham, England.

EDTA, PMSF, 32S-Sulfanilsäure, Tris, Saccharose, Metol, Folin, Triton X-100, Äthylenglycol, Ammoniumheptamolybdat, Citrat, sonstige Salze und Lösungsmittel (p.a.): Merck AG; Darmstadt.
Cytochrom c (Pferdeherz), Oligomycin, Coomassie Brilliant Blue, Acrylamid, Bisacrylamid, Tetramethyläthylendiamin, SDS, Mercapto-äthanol, BrCN, Triton X-100, Dialyseschlauch, Dansylchlorid: Serva GmbH; Heidelberg.

Serum-Albumin (Rind): Behringwerke; Marburg.

Ameisensäure, Trichloressigsäure, Methylglykol: Riedel-DeHaen AG; Seelze Hannover.

Toluol: Aral AG; Ingolstadt

DC-Fertigfolien F 1700-Micropolyamin: Schleicher & Schüll GmbH; Dassel.

Scintimix III: Packard Instruments; Frankfurt.

Dithiothreitol: Sigma Chemical Co.; St. Louis, USA.

Freud's Adjuvans complete: Difco; Ditroit, Michigan, USA.

Sephadex G 25 Coarse: Pharmacia; Upsala, Schweden.

Biogel P-30, Biogel A-0.5m: Bio-Rad; Richmond, Calif., USA.

DEAE-Cellulose: Whatman Ltd.; Maidstone, England.

Saccharose: im Handel erhältlicher Rohrzucker.

Geräte:

Branson-Sonifier Modell S-75, Ultrazentrifuge Beckman Spinco 2, Sorvall-Kühlzentrifuge RC-2, Tri-Carb-Scintillation Spectrometer, Fa. Packard; Beckman DK-1A Spectrophotometer, Eppendorf Tisch-Zentrifuge 3200, Gelschneider (Eigenfabrikat), Eppendorf Photometer 1101 M, Cary, Braun-Küchenmixer.

5. DISKUSSION

5.1. Eigenschaften von Membranproteinen

Unterschiedliche Eigenschaften zwischen membranintegrierten und wasserlöslichen Proteinen lassen sich durch ihre spezifische Umgebung beschreiben. Da sie in direktem Kontakt mit den Phospholipiden der Membranen stehen, wundert es nicht, daß die Polarität von Membranproteinen sehr gering sein kann (28,73,90,114); d.h. Ihr Gehalt an polaren Aminosäuren extrem gering ist. Aus den Sequenzanalysen verschiedener Komponenten des F_o-Membransektors des energietransduzierenden ATPase-Komplexes (4,37,57,93,94) geht hervor, daß polare und apolare Aminosäuren in diskreten Abschnitten der Polypeptidkette zu finden sind. Hydrophobe und hydrophile Bereiche lassen sich in ihr gut abgrenzen. Besonders ausgeprägt ist dies bei der Untereinheit b im bakteriellen Enzymkomplex aus E. coli. Sie besitzt eine ausgesprochen hydrophobe Region von ca. 30 Aminosäuren mit nur einem geladenen Rest, während der übrige Teil einen hohen Anteil polarer und geladener Aminosäuren besitzt (24).

5.2. Funktionen der F_o-Membranproteine

Die Eigenschaften der F_o-Membranproteine werden in eine Verbindung mit ihrer möglichen Funktion gebracht. Während die hydrophoben Domänen der festen Verankerung des Enzymkomplexes in der

Phospholipidschicht dienen sollen, diskutiert man über die Aufgaben der polaren Abschnitte differenzierter:

- a) Beteiligung an der mehrfach nachgewiesenen Protonentranslokation (22, 36, 102, 105, 121) von F_o ; in diesem Zusammenhang Kontakt herzustellen zum wässrigen, elektrolytleitenden Milieu des Cytosols oder der Matrix.
- b) Bindung an, oder Erkennungssignal für andere ATPase-Untereinheiten, vornehmlich an F_1 , das selbst, wenn überhaupt, nur geringen Kontakt zur Lipidschicht hat (65).
- c) Ventilfunktion für den Protonendurchlaß durch schnelle Konformationsänderungen.

5. 3. Eigenschaften der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit

Für die DCCD-bindende Proteolipid-Untereinheit des ATPase-Komplexes lassen sich auf Grund von Daten, gesammelt aus Untersuchungsergebnissen verschiedenster experimenteller Ansatzrichtungen, detaillierte Angaben über seine Struktur und Funktion machen, wie bereits in der Einleitung erläutert wurde. In Abbildung 13 sind die Primärstrukturen von sieben DCCD-bindenden Proteinen wiedergegeben. Die bereits erwähnte Konzentration polarer Aminosäuren am N-terminalen Ende bis zu etwa 10 Aminosäuren und in der Peptidmitte von

PS-3 10 20 30 40 50 60 70 80
 fMSLGLVLAATAVGLGALGAGIGNGLIVSRITIEGIARQPELRPVLTQTMFIGVALVEALPIIGVVFSEIYLGR
 Strept. faec. fMNYIAATAIMGAATIGAGYGNQGVISKTIEGMARQPEMSGQLRTTMFIGVALVEAVPIIGVVIALLVFAV
 E.coli fMENLNWLLYMAAAVMMGLAAITGAATGIGILGGKFLQGAARQPDILRLRTQFFIVMGLVDAIPMIAVGLGLYVMAVA
 Neur. crassa YSSEIAQAMVEVSKNLGMSAAIGLTGAGIGIGLVFAALLNGVARNPALRQGLFSYAILGFAFVEAIGLFDLVALMAKFT
 Sac. cer. fMQLVLAAKYIGAGISTIGLLGAGIGIAIVFAALNGVSRNPSTKDTVPMAILGFALSEATGLFCLMVSFLLLF6V
 RiHerz DITTAAKFIGAGAAATGVAGSGAGIGTGVFGLSIGVARNPSLKQQLFSYAILGFALSEAMGLFCLMVAFLILFAM
 Spinat fMNPLIAAASVIAAGLAVGLASIGPGVGQGTAAAGQAVEGIARQPEAEAGKIRGTLTLLSLAFMEALTIYGLVVALALLFANPFV

DCCD

Abb. 13 Primärstruktur der DCCD-bindenden Proteine, isoliert aus bakteriellen
 Membranen : thermophiles Bakterium PS-3 (37), E.coli (90),
Streptococcus faecalis (64), aus Mitochondrien: Neurospora crassa (93),
Saccharomyces cerevisiae (93), dem Rinderherzen (28,90) und aus
 Chloroplasten (Spinat 94)

Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode wiedergegeben, dessen
 Übersetzung in Abschnitt 6 zu finden ist. Die Nummerierung folgt der
 Sequenz des Peptids aus Neurospora crassa. Identisch besetzte Positio-
 nen wurden umrandet. Die DCCD-bindende Gruppe ist zusätzlich hervor-
 gehoben.

Positionen 40 bis 56, hier und im folgenden bezogen auf das Neurosporaprotein, ist augenscheinlich. Invariant in allen sieben Spezies ist die saure Seitenkette in Position 65, an die selektiv und kovalent DCCD gebunden wird (93). Sie liegt inmitten eines langen hydrophoben Abschnittes von ca. 25 Aminosäuren. Ein etwa gleich großes Stück erstreckt sich von Position 15 bis 40. Die positive Ladung der Lysinseitenkette findet sich nur noch im bakteriellen Protein aus PS 3 in Form eines C-terminalen Arginins und scheint für Struktur und Funktion nicht essentiell zu sein. Im Gegensatz dazu ist das Arginin in Position 45 in allen und die positive Ladung in Position 14 und 50 in den mitochondrialen ATPase-Proteolipid-Untereinheiten konserviert. Die meisten identisch besetzten Positionen in den drei mitochondrialen Sequenzen findet man jedoch im hydrophoben Segment um den DCCD-bindenden Aminosäurerest. Dies könnte auf eine spezifischere Rolle als die bloße Verankerung in der Phospholipidmembran hinweisen.

Diese Vermutung wird durch Untersuchungen mit oligomycinresistenten Mutanten aus Neurospora crassa (89) und Hefe (88) unterstützt. Sämtliche Aminosäureaustausche in den DCCD-bindenden Proteinen befanden sich in diesem Bereich der Peptidkette. Auf eine direkte Rolle der DCCD-bindenden Seitengruppe beim Protonentransport verweisen DCCD-resistente Mutanten von E.coli. In der Aminosäuresequenz der Proteolipide dieser Mutanten fand man einen Austausch

der DCCD-bindenden Asparaginsäure gegen ein Glycin (36, 121). Zusätzliche Information über spezifische Rollen von Aminosäurenresten lieferten DCCD-resistente E.coli-Mutanten von anderen Stämmen. Solche Mutanten zeigten DCCD-resistentes Wachstum ohne Beeinträchtigung ihrer funktionellen Eigenschaften wie ATPase-Aktivität und H⁺-Translokation. Erst bei hohen DCCD-Konzentrationen wurde der ATPase-Komplex gehemmt und DCCD an den Asparaginsäurerest gebunden. Verändert war jedoch der Isoleucinrest 28. Er war ersetzt zum einen durch Valin, in einem anderen Fall durch Threonin. Diese Austausche führten zur DCCD-Resistenz. Die Autoren (35) diskutieren diese Befunde mit einer Beteiligung dieser Aminosäureseitenkette bei der Bindung des DCCD und leiten davon eine enge räumliche Nachbarschaft mit der DCCD-reaktiven Seitengruppe ab.

Die Konformation des mitochondrialen DCCD-bindenden Proteins aus Neurospora crassa, eingebettet in unilamelläre Phospholipidvesikel, wurde von Mao et al. mit Hilfe der zirkulären Dichroismus-Spektroskopie bestimmt (59). Ihre Angaben über vorwiegend α -helikale Anteile und zusätzliche β -Strukturen und ungeordnete Knäuel stimmen gut mit berechneten Sekundärstrukturen der Proteinvorstufe überein, über die Sebald (119) berichtet. Zu einem transmembranen Durchtritt benötigt ein α -Helix-Protein 20 Aminosäuren (59). Wenn die DCCD-bindenden Proteolipiduntereinheiten allein den Protonenkanal bilden, müssen sie den ganzen Membranquerschnitt überbrücken.

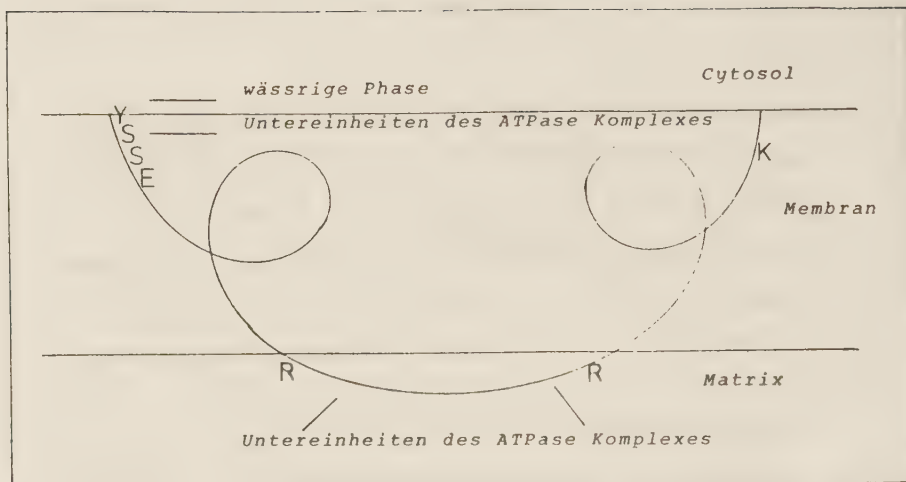


Abb. 14 Aufgrund gesammelter Daten über Funktion und Struktur der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit wurde von Sebald (35) ein sogenanntes "Haarnadelmodell" entwickelt. In diesem Modell soll das hydrophile, N-terminale Peptidende (Y S S E I A ...) Verbindung zur wässrigen Phase oder anderen Proteinuntereinheiten herstellen. In wenigen α -helikalen Windungen überbrückt das hydrophobe Segment von ca. 25 Aminosäuren die Membran. Mit seinem polaren Abschnitt wendet das Protein im wässrigen oder wässrig-lipophilen Grenzbereich und kehrt ebenfalls in α -Helices zur anderen Membranseite zurück.

Die Abbildung beschreibt die Proteolipid-Untereinheit aus Neurospora crassa.

K: Lysinrest in Position 79

R: Argininreste in Position 45 und 50

Unter diesen Vorstellungen läßt sich als Arbeitshypothese ein Modell aufstellen, das Sebald als "Haarnadelmodell" bezeichnet (35). In diesem Modell (Abbildung 14) hat der hydrophile N-Terminus die Aufgabe, Kontakt zur wässrigen Phase oder anderen Proteinuntereinheiten herzustellen. In wenigen α -helikalen Windungen durchtritt das hydrophobe Segment von ca. 25 Aminosäuren die Membran. Das Protein kehrt, ebenfalls in α -Helices, zur anderen Membranseite zurück, nachdem es mit seinem polaren Mittelabschnitt im wässrigen oder wässrig-lipophilen Grenzbereich gewendet hatte.

Der polaren "Schleife" könnten wie dem N-terminalen Proteinabschnitt Aufgaben wie Kontaktaufnahme zum protonenleitenden Milieu oder Verbindung zu anderen Proteinen zukommen.

5. 4. Diskussion der eigenen Ergebnisse

Auf der Grundlage der oben geschilderten Vorstellungen wurden die in dieser Arbeit beschriebenen Oberflächenmarkierungen durchgeführt. Die hier gezeigten Ergebnisse (siehe dazu Abbildung 15) führen zu dem Schluß, daß nur die N-terminale Aminogruppe im Grenzbereich Lipid/Wasser exponiert ist. Alle übrigen mit den angewendeten Methoden erfaßbaren Bereiche sind entweder durch Lipide oder Wechselwirkung mit anderen Proteinen abgeschirmt.

reagible Aminosre. Versuchs- bedingg.	bis-Tyr ¹	α-Tyr ¹	O-Tyr ¹	Lys ¹⁴	O-Tyr ⁵⁶	Lys ⁷⁹
2% SDS	+	+	(+) schwach	+	+	n.b.
3:3:1 (C:M:W)	-	+	-	+	-	+
SMP	-	+	-	-	-	-
Mito	-	+	-	-	-	-

Abb. 15 Dansylchlorid-Markierung der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit aus Neurospora crassa

Die Ergebnisse der "Oberflächenmarkierung" mit Dansylchlorid werden nochmals zusammengefaßt. In der waagrechten Reihe sind die reagiblen Aminosäuren des Peptids aufgeführt mit ihren Positionen in der Kette des Makromoleküls. Senkrecht dazu die Versuchsbedingungen, die im Einzelnen unter Ergebnissen zu finden sind:

2% SDS : weitgehende Kettenentfaltung des isolierten Proteins in Natriumdo-decylsulfat

3:3:1 : postulierte native, gelöste Form (C:M:W) des isolierten Proteins

SMP : Markierung submitochondrialer Partikel; Zugänglichkeit der mitochondrialen Membran von Cytosol- und Matrix-seite

Mito : Markierung nur von der Cytosolseite(theor.)

Bevor die Ergebnisse dieser Untersuchungen interpretiert werden, soll noch einmal definiert werden, was Zugänglichkeit für Oberflächenreagenzien heißt. Chemisch markiert werden nur solche Gruppen, die auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften (Nukleophilie für Dansylchlorid und DABS) mit dem Marker reagieren können und so exponiert sind, daß sich die Reaktionspartner im gleichen Milieu befinden (wässrige Phase für DABS, Grenzbereich Wasser/Lipide für Dansylchlorid). Die chemische Eigenschaft eines Aminosäurerestes kann durch intramolekulare oder intermolekulare Wechselwirkungen (H-Brücken, polare Bindung) drastisch verändert sein, so daß sich diese Gruppen der Markierung entziehen. Es darf angenommen werden, daß unter den beschriebenen Versuchsbedingungen die Markierung mitochondrialer Membranfraktionen unter annähernd physiologischen Bedingungen durchgeführt wurde. Als Kriterium galt die oligomycin-hemmbar ATPase-Aktivität. Außerdem muß davon ausgegangen werden, daß sich markierte und nicht markierte Proteinfractionen bei der Prozedur der Anreicherung und Isolierung ähnlich verhalten und sich nicht entmischen.

5. 4. 1. Markierungen mit Dansylchlorid

Konformationsänderungen des DCCD-bindenden Proteolipids durch Wechsel des Lösungsmittels haben Mao et al. beschrieben (59). In erster Linie änderte sich der Anteil der β -Strukturen und des ungeordneten

Knäuels, während die α -helicalen Anteile relativ konstant blieben. Unterschiedliche Markierungsergebnisse des isolierten Proteolipids in 2% SDS und in organischen Lösungsmitteln Chloroform/Methanol/Wasser (C:M:W 3:3:1) weisen auch auf eine unterschiedliche Molekülfaltung in den beiden Lösungsmitteln hin. Offensichtlich sind die Hydroxylgruppen der Tyrosine in Position 1 und 56 durch intramolekulare Wechselwirkungen abgeschirmt, wenn das Proteolipid in organischen Lösungsmitteln gelöst ist. In 2% SDS dagegen werden alle denkbaren Seitenketten markiert. Damit wurde gezeigt, daß alle theoretisch reagiblen Gruppen auch tatsächlich das Reagenz binden.

Zusätzliche Abschirmeffekte durch Phospholipide oder andere Proteinuntereinheiten beobachtet man im membranintegrierten ATPase-Komplex. Die Lysine 14 und 79 werden nicht mehr markiert, obwohl die ϵ -Aminogruppe zu den reaktivsten Gruppen für Dansylchlorid gehört (30), deshalb sind Effekte durch Konzentrations- oder Inkubationszeitunterschiede sehr unwahrscheinlich.

Interessant sind diese Befunde im Zusammenhang mit Vorstellungen über die stabile Verankerung der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit in der Phospholipidschicht der Membran. Positive Ladungen in Proteinen können Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Oberfläche der Phospholipidschicht eingehen und dadurch ihre Position fixieren.

Die Lage der beiden Lysine an den Enden der Peptidkette macht sie zu denkbaren Aufhängepunkten der "Haarnadel" an der Oberfläche der Membran. Aufgrund der vorliegenden Markierungsergebnisse sind die Lysine 14 und 79 tiefer in der Phospholipidschicht verborgen oder durch Wechselwirkung mit anderen Proteinuntereinheiten abgeschirmt. Daher scheidet ein Modell, in dem die N- und C-terminalen Abschnitte frei in die wässrige Phase ragen und so als Protonenempfänger dienen könnten, aus. Die Funktion als Protonenakzeptor könnte unter Berücksichtigung der später diskutierten Ergebnisse über den proteolytischen Zugang der N-terminalen Sequenz die N-terminale α -Aminogruppe des Tyrosins übernehmen. Doch spricht die Tatsache, daß diese Aminosäure auch isofunktionell nicht konserviert wurde (Abb.13) gegen diese Annahme.

Die Markierungsergebnisse sind in Mitochondrien und SMP gleich. Die N-terminale Aminogruppe wird markiert, gleichgültig, ob das Reagenz nur von der Außenseite (Mitochondrien) oder, im Falle der subm. Partikel, von beiden Seiten der Membran angreift. Drei Möglichkeiten erklären diesen Befund:

- a) Der N-Terminus ist dem Intermembranraum zugewandt.
- b) Der N-Terminus zumindest eines Teils der oligomeren Proteolipide ist nach außen orientiert.
- c) Der N-Terminus ist der Matrix zugewandt, das Reagenz konnte aber unter den Inkubationsbedingungen die durchlässig gewordene Membran passieren, was prinzipiell nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

5. 4. 2. Oberflächenmarkierung mit p-Diazoniumbenzol-(35S)-sulfonsäure (DABS)

Die polare, zweifach negativ geladene Diazobenzolsulfonsäure ist ein Reagenz, das im Gegensatz zu Dansylchlorid nur im wässrigen Milieu reagieren kann. Außerdem wäre eine Reaktion mit der Guanidinogruppe der Arginine über die Erfassung der gebundenen 35S-Radioaktivität feststellbar.

35S-Radioaktivität war in den elektrophoretisch aufgetrennten Immunpräzipitaten des ATPase-Komplexes nicht mit dem Proetolipid assoziiert. Nach quantitativen Berechnungen hätte die alleinige Bindung an die N-terminale $\mathcal{L}$ -Aminogruppe ausgereicht, um 35S-Radioaktivitätsanreicherung im Proteolipidgipfel zu finden. Die freie Exposition der N-terminalen $\mathcal{L}$ -Aminogruppe in die wässrige Phase ist damit sehr unwahrscheinlich. Daß die markierten ATPase-Komplexe sich nicht der Antigen-Antikörper-Reaktion entziehen, zeigen Versuche mit hochmarkierten Enzym-Komplexen aus anderen Spezies (56) und die Tatsache, daß die $\mathcal{L}$ - und β -Untereinheiten auch markiert wurden. Eine spezifische Nichtdissoziation der markierten Immunkomplexe ist ebenfalls unwahrscheinlich, da das 35S/3H-Verhältnis der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine und die im Auftragspalt liegendegebliebene, nicht gewanderte Proteinfraction gleich ist.

5. 4. 3. Einsatz von Proteasen

Mit dem Einsatz von Proteasen sollte die proteolytische Zugänglichkeit der beiden Kettenenden und Kettenmitte untersucht werden. Bei freiem Zugang des spaltenden Enzyms Trypsin sind die zu erwartenden Spaltstellen hinter Lysin 14, Lysin 79 an den Peptidenden und Arginin 46 sowie Arginin 50 in der Peptidmitte. In den hier vorliegenden Experimenten gelang es nicht, trypsinspezifische Spaltprodukte in signifikanter Menge zu isolieren.

Papain und Bromelain sind Proteasen, die letztlich zur Totalhydrolyse von Peptiden führen. Das Hauptaugenmerk wurde, nach den Resultaten der bisherigen Experimente, auf die polare N-terminale Aminosäuresequenz Tyrosin 1 bis Serin 13 gelegt, zumal in diesem Segment mit den zwei Glutaminsäureresten und in eingeschränktem Maße auch den drei Serinresten potentielle Protonenakzeptoren zu finden sind. Doch auch in diesen Experimenten konnte kein proteolytischer Abbau nachgewiesen werden. Diese Befunde stützen die Ergebnisse der DABS-Markierung und decken sich mit Markierungsergebnissen des Rinderherz-Enzymkomplexes (56). Doch sollte darauf hingewiesen werden, daß Verluste eventuell vorhandener Spaltprodukte bei der Anreicherungs-methode, wie sie für das intakte Protein entwickelt wurde, möglich sind, wenn man in Betracht zieht, daß die homologen Proteine aus verschiedenen

Organismen im Detail unterschiedliche Lösungseigenschaften haben und deswegen unterschiedliche Isolierungsmethoden angewendet werden mußten. Veränderte Lösungseigenschaften sind vor allem für Produkte nach Spaltung in der Kettenmitte denkbar.

5. 4. 4. Topographie der DCCD-bindenden Proteolipid-Untereinheit

Auf die nahezu vollständige Versenkung des DCCD-bindenden Proteins in der Membran und im ATPase-Komplex weisen mehrere Beobachtungen aus anderen Laboratorien hin. In Quervernetzungsexperimenten fanden Douglas und Mitarbeiter (112) im isolierten ATPase-Komplex aus Hefe eine Vernetzung des DCCD-bindenden Proteolipids mit der Untereinheit 5, die der γ -Untereinheit entspricht, und mehrerer Proteolipide untereinander. Seine direkte Exposition zur Lipidphase der Membran wurde in Bindungsstudien mit photoreaktiven Lipiden gezeigt (65). Dabei wurde das Protein sowohl mit Lipiden markiert, die nur an solche Peptidsequenzen binden sollen, die auf den hydrophoben Bereich beschränkt sind, als auch von solchen, die in der polaren Region der Phospholipidschicht reagieren. Der Hauptteil (> 90%) des lipophilen Photoreagens war jedoch an andere Proteinuntereinheiten des Membransektors gebunden. Ebenfalls photoaktivierbare, lipophile Reagenzien setzten Hoppe et al. zur Markierung membranintegrierter F_o - Untereinheiten aus Neurospora crassa und E.coli ein (38). In diesen Experimenten

wurde die Markierung bis zur Reagenzbindung an die Aminosäurenseitenkette verfolgt. Die Ergebnisse zeigen, daß gerade die N- und C-terminalen Anteile der Peptidkette innerhalb der Phospholipidschicht reagieren. So wurden u. a. die Methioninseitenketten in den Positionen 9 und 77 des Neurosporaproteins markiert. Die Befunde stehen im Einklang mit den hier beschriebenen Ergebnissen, wonach Lysinreste in Position 14 und 79 nicht wasserexponibel sind.

Proteolytischen Abbau des membranintegrierten ATPase-Komplexes aus Streptococcus faecalis mit besonderem Augenmerk auf die DCCD-bindende Untereinheit beschrieben andere Autoren (64). In ihren Versuchen war das Protein für enzymatische Verdauung unzugänglich. In topographischen Studien, die den Enzymkomplex aus Rinderherzmitochondrien charakterisierten, wurde keine spezifische 35S-Radioaktivität des wasserlöslichen Oberflächenreagenz Diazobenzolsulfonsäure an diese Untereinheit gefunden (56).

Wenn die DCCD-bindende ATPase-Untereinheit vollständig in der Lipidmembran und im ATPase-Komplex verborgen ist, so ist wahrscheinlich, daß zusätzliche Komponenten am Protonentransport beteiligt sind und eine wichtige Aufgabe der polaren Domänen in der Kontaktherstellung zu anderen Untereinheiten besteht. Für beide Vermutungen gibt es Hinweise: obwohl beschrieben ist, daß Proteolipidvesikel,

rekonstituiert aus dem Chloroplastenproteolipid, allein in der Lage sind, Protonen zu transportieren (9, 50, 102), haben Rekonstitutionsversuche (104) und Mutantencharakterisierung von E.coli (22, 67) gezeigt, daß zusätzliche Komponenten für die DCCD-hemm-
baren Protonentranslokationen notwendig sind.

Die mögliche Funktion der Kontaktherstellung zu Proteinuntereinheiten von F₁ wird durch Experimente favorisiert, die mit E.coli-Membranen durchgeführt wurden (54): durch Bindung spezifischer Antikörper gegen das DCCD-bindende Protein an die F₁-befreite Bakterienmembran wurde das entstandene "Protonenleck" geflickt. Die Hemmung des Protonenflusses war nur möglich, wenn der Antikörper auf der "F₁-Seite" der Membran binden konnte. Aus diesen Beobachtungen wird geschlossen, daß durch Entfernen des F₁-Anteiles des ATPase-Komplexes das Proteolipid wenigstens zum Teil "freigelegt" wird. Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten kann über diesen "freigelegten" Teil der Polypeptidkette nichts ausgesagt werden. Markierungsexperimente mit Vesikelfractionen oder Mutanten, denen F₁ fehlt, oder mit rekonstituierten Proteolipidvesikeln, die nur die Untereinheit als Proteinkomponenten enthalten, sind denkbar und könnten Grundlage weiterer Untersuchungen zur Topographie des ATPase-Komplexes sein.

6. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Aminosäuren

Dreibuchstaben Code	Einbuchstaben Code	
Asp	D	Asparaginsäure
Asn	N	Asparagin
Asx	B	Asp oder Asn
Thr	T	Threonin
Ser	S	Serin
Glu	E	Glutaminsäure
Gln	Q	Glutamin
Glx	Z	Glu oder Gln
Pro	P	Prolin
Gly	G	Glycin
Ala	A	Alanin
Cys	C	Cystein
Val	V	Valin
Met	M	Methionin
MSO		Methioninsulfoxid
MSN		Methioninsulfon
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Phe	F	Phenylalanin
Tyr	Y	Tyrosin
His	H	Histidin
Trp	W	Tryptophan
Lys	K	Lysin
Arg	R	Arginin
Hse		Homoserin

dansylierte Aminosäuren:

bis-Tyr	Bisdansyltyrosin
α -Tyr	α -Aminodansyltyrosin
O -Tyr	O-Phenoyldansyltyrosin
ϵ -Lys	ϵ - Aminodansyllysin

BrCN	Bromcyan
DABS	p-Diazoniumbenzolsulfonylsäure
Dansyl	N,N-Dimethylaminonaphthalinsulfonyl
DCCD	N,N-Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE	Dimethylaminoäthyl
DITC	p-Phenylendiisothiocyanat
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
$F_1 \hat{=} F1$	wasserlösliche ATPase, Kopplungs- faktor F_1 , siehe Text Seite 7 ff.
OS-	olygomycin sensitiv
OSCP	Olygomycin-Sensitivity-Confering- Protein
$P_a \hat{=} Pa$	anorganisches Phosphat
PL	Proteolipid
PMSF	Phenylmethan-Sulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMP	Submitochondriale Partikel
SET	Saccharose-EDTA-Tris
SETra	Saccharose-EDTA-Triäthanolamin
TEA	Tris-EDTA-ATP
Tra	Triäthanolamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T - X 100	Triton-X- 100

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die ATPase-Komplexe aus Mitochondrien-, Chloroplasten- und Bakterienzellmembranen spielen eine zentrale Rolle bei der Bildung von ATP durch oxidative bzw. Photo-Phosphorylierung. Der Enzymkomplex setzt sich zusammen aus einem wasserlöslichen Anteil, dem F_1 , das Träger der katalytischen Aktivität ist, und einen membranintegrierten Anteil, dem F_0 , durch den Protonen transloziert werden, wenn der Komplex ATP hydrolysiert oder synthetisiert. Rekonstitutionsexperimente und Charakterisierung von Mutanten haben gezeigt, daß eine Untereinheit des Membransektors F_0 direkt an der Protonentranslokation beteiligt ist. Dieses Protein hat ein Molekulargewicht von ca. 8000 Dalton und bindet spezifisch und kovalent den ATPase-Hemmstoff Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD-bindendes Protein), wodurch der Protonenfluß durch die Membran unterbunden wird. Im Zusammenhang mit seiner möglichen Funktion als Protonophor ist seine Orientierung im vektoriellen Prozeß der Energietransduktion von Bedeutung. Die Kenntnis der Primärstrukturen aus sieben verschiedenen Spezies, physikalische Daten und Mutantencharakterisierung haben zu dem Modell einer transmembranen "Haarnadelform" geführt, das eine Polypeptidkette mit einer zweimaligen Membranpassage der Membran beschreibt, wobei polare Domänen der Peptidkette sich außerhalb der Membran befinden und Kontakt mit wässrigem Milieu oder mit anderen Proteinen haben.

Am Beispiel der DCCD-bindenden Proteolipiduntereinheit aus Neurospora crassa sollte mit Hilfe von "Oberflächenreagenzien" p-Diazoniumbenzol-(35S)sulfonsäure (DABS) und 1-Dimethylamino-naphtalin-5-sulfonylchlorid (Dansylchlorid) sowie durch Einsatz von Proteasen (Trypsin, Bromelain, Papain) das Ausmaß exponierter Sequenzanteile eruiert werden.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß membranintegriert und unter Versuchsbedingungen, wie sie oben beschrieben sind, nur die N-terminale α -Aminogruppe des Proteins für die benutzten Sonden zugänglich ist. Polare Abschnitte wie die N-terminale Aminosäuresequenz bis zu Lysin 14, der Mittelabschnitt Arginin 45 bis Tyr 56 als denkbare Schleife und der C-terminale Bereich mit einem Lysin in Position 79 waren unzugänglich. Das N-terminale Tyrosin ist dem Intermembranraum, also dem cytosolischen Raum, zugewandt. Die polare "Schleife" nach dem "Haarnadelmodell" muß dann durch andere Untereinheiten des ATPase-Komplexes abgeschirmt sein.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Akiey, C.W., Spitzberg, V. und Edelstein, S.J. (1983) J.Biol.Chem. 258, 3222-3229
- (2) Altendorf, K., Herold, F.M., und Simoni, R.D. (1974) J.Biol.Chem. 249, 4587-4593
- (3) Amzel, L.M., McKinney, M., Narayanan, P., und Pedersen, P.L. (1982) Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 79, PP 5852-5856
- (4) Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. und Young, I.C. (1981) Nature 290, 457-465.
- (5) Beechey, R.B., Hubbard, S.A., Linnett, P.E., Mitchell, A.D. und Munn, E.A. (1975) Biochem.J. 148, 535-537
- (6) Bossard, M.J., Vik, T.A. und Schuster, M. (1980) J.Biol. Chem. 255, 5342-5346.
- (7) Bragg, P.D. und Hou, C. (1980) Eur.J.Biochem. 106, 495-503.
- (8) Capaldi, R.A. und Vanderkooi, G. (1972) Proc.Natl. Acad. Sci.(USA) 69, 930-932.
- (9) Celis, H. (1980) Biochem.Biophys.Res.Comm. 92, 26-30.
- (10) Cooper, M.B., Estall, M.R. und Rabin, B.R. (1981) Biochem.J. 196, 585-589.
- (11) De Pierre, J.W. und Ernster, L. (1977) Ann.Rev.Biochem. 46, 201-262.
- (12) De Pierre, J.W., Dallner, G. (1975) Biochem.Biophys.Acta 415, 411-472
- (13) Dianoux, A.C., Bos, M. und Vijnals, P.V. (1978) Eur.J.Biochem. 88, 69-77.
- (14) Doherty, A., und Gray (1980) Eur.J.Biochem. 108, 131-136.
- (15) Downie, I.A., Gibson, F. und Cox, G.B. (1979) Ann.Rev.Biochem. 48, 103-131.

- (16) Dunham, K.R. und Selman, B.R. (1981) Fed.Proc. 40, 1734.
- (17) Dunn, S.D., Heppel, L.A. und Fullmer, C.S. (1980) J.Biol. Chem. 255, 6891-6896.
- (18) Eytan, G.D. und Schatz, G. (1975) J.Biol. Chem. 250, 767.
- (19) Fessenden, J.M. und Racker, E. (1966) J.Biol. Chem. 241, 2483-2489.
- (20) Fillingame, R.H. (1976) J.Biol. Chem. 251, 6630-6637.
- (21) Foster, D.L. und Fillingame, R.H. (1982) J.Biol. Chem. 257, 2009-2015.
- (22) Friedl, P., Bienhaus, G., Hoppe, J. und Schairer, H.U. (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 78, 6643-6646.
- (23) Futai, M. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 79, 1231-1237.
- (24) Gay, N.J. und Walker, J.E. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 3919-3926.
- (25) Graf, T.M. (1975) Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität München.
- (26) Graf, T.M. und Sebald, W. (1978) FEBS Lett. 94, 218-222.
- (28) Graf, T.M. (1979) Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität München.
- (29) Graf-Koller, G. (1975) Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität München.
- (30) Gray, W.R. (1972) Meth. Enzymol. 25, 121-138.
- (32) Harmon, H.J., Hall, J.D., Crane, F.L. (1974) Biochem. Biophys. Acta 344, 119-155.
- (33) Higgins, H.G. und Harrington, U.G. (1959) Arch. of Biochem. and Biophys. 85, 409-425.
- (34) Hinkle, P.C. (1973) Fed. Proc. 32, 1988-1992.
- (35) Hoppe, J., Schairer, H.U. und Sebald, W. (1980) Eur. J. Biochem. 112, 17-24.
- (36) Hoppe, J., Schairer, H.U. und Sebald, W. (1980) FEBS Lett. 109, 107-111.

- (37) Hoppe, J. und Sebald, W. (1980) Eur. J. Biochem. 107, 57-65.
- (38) Hoppe, J. und Sebald, W. (1984) H^+ -ATPase (ATP Synthetase), Structure, Function, Biogenesis, The F_0F_1 Complex of Coupling Membranes. S. Papa et al. eds. pp 163-171. ICSU Press by Adriatica Editrice. Bari, Italy.
- (39) Howard, A. N. und Wild, F. (1957) Biochemistry 65, 651-659.
- (40) Hoyer, L. W., Trebold, N. C. (1970), J. Clin. Invest. 49, 87.
- (41) Hubbard, A. L., Cohn, Z. A. (1976) Biochemical Analysis of Membranes, (A. H. Maddy ed.) Chapman and Hall, London 427-501
- (42) Juliano, R. L. (1973) Biochem. Biophys. Acta 300, 341-378.
- (43) Kagawa, Y. und Racker, E. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2475-2482.
- (44) Kagawa, Y. (1972) Biochem. Biophys. Acta 265, 297-338.
- (45) Kagawa, Y., Sone, Y., Yoshida, M., Hirata, H. und Okamoto, H. (1976) J. Biochem. 80, 141-151.
- (46) Kagawa, Y. (1978) Biochem. Biophys. Acta 505, 45-93.
- (47) Kagawa, Y. (1981) in: Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes (Shuladev, V. P. and Hinkle, P. eds) Addison-Wesley, MA. pp. 435-448.
- (48) Kanazawa, H., Mabuchi, K., Kayano, T., Noumi, T., Sehiya, T. und Futai, M. (1981) Biochem. Biophys. Res. Comm. 103, 613-620.
- (49) Klein, G., Satre, M., Dianoux, A. C. und Vignais, P. V. (1980) Biochemistry 19, 2919-2925.
- (50) Koniski, T., Packer, L., und Griddle, R. (1979) Methods Enzymol. 55, 414-418.
- (51) Koslov, A. und Skulachev, V. P. (1977) Biochem. Biophys. Acta 463, 29-89.
- (52) Kozlov, I. A. und Milgrom, Y. M. (1980) Eur. J. Biochem. 106, 457-462.
- (53) Lehninger, A. L. (1977) in : Biochemie Weinheim, New York, Verlag Chemie p. 315
- (54) Loo, T. W. und Bragg, P. D. (1982) Biochem. Biophys. Res.

Comm. 100,400-406.

- (55) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275.
- (56) Ludwig, B., Prochaska, L., und Capaldi, R.A. (1980) Biochemistry 19, 1516-1523.
- (57) Macino, G. und Tzagoloff, A. (1980) Cell 507-517.
- (58) Marakiel, M.A., Imam, G., Nelson, P., Pieniazek, N.J., Stephien, P.P. und Kuntzel, H. (1977) Eur.J.Biol. 76, 345-354.
- (59) Mao, D., Wachter, E., and Wallace, B.A. (1982) Biochemistry 21, 4960-4968.
- (60) McLennan, D. und Tzagoloff, A. (1968) Biochemistry 7, 1603-1610.
- (61) Mitchell, P. (1961) Nature 191, 144-148.
- (62) Mitchell, P. and Moyle, I. (1965) Nature 208, 147-151.
- (63) Mitchell, P. (1974) FEBS Lett. 43, 189-194.
- (64) Modyanov, N.N., Kocherinskaya, S.A., Shakhparonov, M.I. (1984) in: H^+ -ATPase (ATP-Synthetase), Structure, Function, Biogenesis. The F_0F_1 Complex of Coupling Membranes S.Papa et al. eds. pp.163-171. ICSU Press by Adriatica Editrice Bari, Italy.
- (65) Montecucco, C., Dabbeni-Sala, F., Friedl, P. und Galante, Y.M. (1983) Eur.J.Biochem. 132, 189-194.
- (66) Morrison, M. (1974) Methods Enzymol. 32, 103-109.
- (67) Mosher, M.E., Kay-Peters, L. und Fillingame (1981) Fed.Proc. 40, 1735.
- (68) Negrin, R.S., Foster, D.L. und Fillingame R.H. (1980) Biol.Chem. 255, 5643-5648.
- (69) Nielsen, J., Hansen, F.G., Hoppe, J. und v.Meyenburg, K. (1981) Mol.Gen Genetic 184, 33-39.
- (70) Nilsson, O.S., Depierre, J.W. und Dallner, G. (1978) Biochem.Biophys. Acta 511 (1), 93-104.

- (71) Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H., Yoshida, M. und Kagawa, Y. (1977) J. Biol. Chem. 252, 6125-6131.
- (72) Orian, J. M., Murphy, M. und Marzuki, S. (1981) Biochem. Biophys. Acta 652, 234-239.
- (73) Ovchinnikov, Y. A., Abdulaer, N. G., Feigina, M. Y., Kiseler, A. V. und Lobanov, N. A. (1979) FEBS Lett. 84, 1 - 4 .
- (74) Ovchinnikov, Y. A., Abdulaer, N. G., Feigina, M. Y., Kiseler, A. V. and Lobanov, N. A. (1979) FEBS Lett. 100, 219-224.
- (75) Panet, R. und Sanadi, R. D. (1976) in: Current Topics in Membranes and Transport (Bronner, V. und Klemm, A. eds.) Vol. 8: 99-160, Academic Press, New York, San Francisco, London.
- (76) Paradies, H. H. und Schmidt, U. D. (1979) J. Biol. Chem. 254, 5257-5263.
- (77) Pedersen, P. L. (1975) Bioenergetics 6, 243-275.
- (78) Penefsky, H. S., Pullman, M. E., Datta, A. und Racker, E. (1960) J. Biol. Chem. 235, 3330-3336.
- (79) Penefsky, H. S. (1974) The Enzymes Vol. X, (P. D. Boyer ed.) Academic Press, N. Y. pp. 375-394.
- (80) Phillipe, M. and Schrevel, J. (1981) Biol. Cell 39, A 13
- (81) Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A. und Racker, E. (1960) J. Biol. Chem. 235, 3322-3329.
- (82) Racker, E. (1962) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 48, 1659-1663.
- (83) Racker, E. und Stoeckenius, W. (1974) J. Biol. Chem. 249, 662-663.
- (84) Rott, R. und Nelson, N. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9224-9228.
- (85) Sebald, W., Machleidt, W. und Otto, J. (1973) Eur. J. Biochem. 38, 311-324.
- (86) Sebald, W., Graf, T., and Wild, G. (1976) in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Th. Bücher et al. eds.) Elsevier/North-Holland. Amsterdam, pp. 167-174.

- (87) Sebald, W. (1977) Biochem. Biophys. Acta 463, 1-27.
- (88) Sebald, W., Wachter, E. und Tzagoloff, A. (1977) in: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, V. et al. eds.) Walter de Gruyter, Berlin pp. 441-449.
- (89) Sebald, W., Sebald-Althaus, M. und Wachter, E. (1977) in: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W. et al. eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 433-440.
- (90) Sebald, W., Hoppe, J. und Wachter, E. (1979) in: Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport (Quagliariello, E. et al., eds) pp 63-74, Elsevier North-Holland Biochemical Press, Amsterdam.
- (91) Sebald, W., Neupert, W. und Weiss, H. (1979) Meth. Enzym. 55, 144-148.
- (92) Sebald, W., Graf, T. und Lukins, H. B. (1979) Eur. J. Biochem. 93, 587-599.
- (93) Sebald, W., Machleidt, W. und Wachter, E. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci 77, 785-789.
- (94) Sebald, W. und Wachter, E. (1980) FEBS Lett. 122, 307-311.
- (95) Sebald, W. et al. Manuskript in Vorbereitung
- (97) Sebald, W. and Kruse, B. (1984) in: H^+ -ATPase (ATP Synthase), Structure, Function, Biogenesis. The F_0F_1 Complex of Coupling Membranes. S. Papa et al. eds. 67-75. ICSU Press by Adriatica Editrice, Bari, Italy.
- (98) Senior, A. E. (1973) Biochem. Biophys. Acta 301, 249-277.
- (99) Schneider, E., Friedl, P., Schwulera, U. und Dose, K. (1980) Eur. J. Biochem. 108, 331-336.
- (100) Sherman, P. A. und Wimmer, M. J. Eur. J. Biochem. (1984), 367-371.
- (101) Sigrist-Nelson, K., Sigrist, H. und Azzi, A. (1978) Eur. J. Biochem. 92, 9-14.
- (102) Sigrist-Nelson und Azzi, A. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10638-10643.

- (103) Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H., Okamoto, H. und Kagawa, Y. (1976) J. Membr. Biol. 30, 121-134.
- (104) Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H. und Kagawa, Y. (1978) J. Biochem. 85, 503-509.
- (105) Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H. und Kagawa, Y. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 4219-4223.
- (106) Steffens, K., Kiltz, H. H., Schneider, E., Schmid, R. und Altendorf, K. (1982) FEBS Lett. 142, 151-154.
- (107) Sternweis, P. C. und Smith, J. B. (1980) Biochemistry 19, 526-531.
- (108) Takagi, T. und Kubo, K. (1979) Biochim. Biophys. Acta 578, 68-75.
- (109) Tiedge, H., Schäfer, G. und Mayer, F. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 37-45.
- (110) Todd, R. D., Griesenbeck, T. A. und Douglas, M. G. (1980) J. Biol. Chem. 255, 5461-5467.
- (111) Todd, R. D., Buck, M. A. und Douglas, M. G. (1981) J. Biol. Chem. 9037-9043.
- (112) Todd, R. D. und Douglas, M. G. (1981) 256, 6984-6989.
- (113) Todd, R. D. und Douglas, M. G. (1981) 256, 6990-6994.
- (114) Tomita, M. und Machesi, V. T. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 72, 2964-2968.
- (115) Tsuprun, V. L., Mesyanzkinova, I. V., Kozlov, I. A. und Orlova, E. V. (1984) FEBS Lett. 167, 285-290.
- (116) Tzagaloff, A. (1976) in: The Enzymes of Biological Membranes Vol. 4 (A. Martonosi ed.) John Wiley and Sons, London, N. Y. pp. 103-124.
- (117) Tzagaloff, A., Macino, G. und Sebald, W. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 419-441.
- (118) Verschoor, G. I., van der Shins, P. R. und Slater, E. C. (1977) Biochim. Biophys. Acta 462, 438-449.
- (119) Viebrock, A., Perz, A. und Sebald, W. (1982) EMBO J. 1, Nr. 5, 565-571.

- (120) Vogel, H.J. (1956) Microbiol. Gen. Bull. 13, 42.
- (121) Wachter, E., Schmid, R., Deckers, G. und Altendorf, K. (1980) FEBS Lett. 113, 265-270.
- (122) Wakabayashi, U., Kagawa, Y. und Amos, L. (1977) J. Mol. Biol. 117, 515-519.
- (123) Weiss, H., von Jagow, G., Klingenberg, E.M. und Bücher, Th. (1970) Eur. J. Biochem. 14, 75-82.
- (124) Wild, G., (1980) Dissertation im Fachbereich Humanmedizin der Universität München
- (125) Witkop, B. (1961) Advan. Protein Chem. 16, 221-321.
- (126) Yamanaka, N., Dramer, D.W. (1976) Biochim. Biophys. Acta 426, 132-147.
- (127) Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H. und Kagawa, Y. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 936-940.
- (128) Yoshida, M., Poser, J.W. und Allison, W.S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 148-153.
- (129) Young, G.P. and Alpers, D.H. (1981) Biochim. Biophys. Acta 640 (1), 131-141.
- (130) Zwaal, R.F.A., Roslofsen, B., Colley, C.M. (1973) Biochim. Biophys. Acta 300, 159-182.

LEBENS LAUF

12. April 1949 geboren in Karlsruhe als jüngstes
von vier Kindern
Eltern: Martin Graf, Metzgermeister
Lina, geb. Schneider
- April 1956- Besuch der Grundschule in Karlsruhe
April 1960
- April 1960- Besuch des humanistischen Gymnasiums
Juli 1968 in Karlsruhe mit dem Abitur als Abschluß
- August 1966- Aufenthalt in Hereford, Texas, im Rah-
August 1967 men eines Austauschprogrammes; High
School Abschluß
- Juli 1968- Ableistung des Grundwehrdienstes
Dezember 1969
- Oktober 1969- Studium an der Universität Freiburg
März 1972 in den Fachrichtungen Biologie/Chemie
- ab April 1972 Fortsetzung des Hochschulstudiums an
der Universität München
- Oktober 1974 Diplom-Hauptprüfung
- Oktober 1974- Durchführung der Diplomarbeit über die
Oktober 1975 Oberflächenstruktur der Cytochrom-
oxidase in Mitochondrien aus Neurospora
crassa unter Leitung von Prof.Dr.Dr.h.c.
Th. Bücher und Priv.-Doz. Dr.W.Se bald
- Mai 1975 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der Universität München
- Oktober 1975- Durchführung der Doktorarbeit am Institut
August 1978 für Physiol. Chemie mit dem Ziel der

Promotion zum Dr.rer.nat. an der
Fakultät Biologie der Universität
München

August 1978-
Oktober 1980 Durchführung der Doktorarbeit an der
Fakultät Medizin am Institut für
Physiol. Chemie unter Leitung von
Dr.rer.nat. E.Wachter über die
Orientierung der DCCD-bindenden Proteo-
lipid-Untereinheit des ATPase Komplexes
in der mitochondrialen Innenmembran
aus Neurospora crassa

Dezember 1979 Promotion zum Dr.rer.nat.

Oktober 1981 dritte ärztliche Prüfung

29.10.1981 Erteilung der Approbation als Arzt

Februar 1982-
April 1984 Klinische Tätigkeit als Assistenzarzt
in der Abteilung für Anaesthesie der
Krankenanstalt des Dritten Ordens,
München, unter Leitung von Chefarzt
Dr. O. Zierl

Mai 1984-
März 1986 Fortsetzung der klinischen Arbeit als
Assistenzarzt in der IV. Medizinischen
Abteilung des Städtischen Kranken-
hauses München-Schwabing unter Leitung
von Chefarzt Prof. E. Holzer

April 1986 Wechsel zur I. Medizinischen Abteilung
des Krankenhauses München-Schwabing,
Leitung: Dr. W. Kaboth

Persönliche Daten:

31.10.1974 Heirat mit Gertrud Koller, Diplombiologin
1. 6.1975 Geburt unseres Sohnes Nicolas
22.12.1976 Geburt unserer Tochter Stephanie
22. 2.1983 Geburt unserer Tochter Hannah

